

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Léon-Georges CHEVANCE

Première thèse

L'ANAPHYLAXIE NASALE

ÉTUDE DE MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

Deuxième thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 24 Novembre 1970

M. PRENANT
M. COUTEAUX
M. BUSSARD

Président

Examineurs

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Léon-Georges CHEVANCE

Première thèse

L'ANAPHYLAXIE NASALE
ÉTUDE DE MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

Deuxième thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 24 Novembre 1970

M. PRENANT
M. COUTEAUX
M. BUSSARD

Président

| *Examineurs*



THÈSES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES NATURELLES

Par

Léon-Georges CHEVANCE

Présentée par

L'ASSEMBLÉE NATIONALE

ÉTUDE DE MOUVEMENTS EXPÉRIMENTAUX

Présentée par

PROFESSEUR DONNÉ PAR LA FACULTÉ

Le 10 Mars 1904

M. ERASME
M. COCHET
M. BISSARD



S O M M A I R E

.....

	Pages
I - <u>INTRODUCTION</u>	1
Définition. Notions expérimentales et de point. Problèmes posés à l'égard de la physiologie des antigènes particulaires dans la réaction anaphylactique.	
II - <u>NOTES DE LA PHYSIOLOGIE RESPIRATOIRE DE LA NASALE</u>	2
L'ANAPHYLAXIE NASALE	
III - <u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	11
Le pollen de graminées. Techniques de sensibilisation- étude	
ÉTUDE DE MODÈLES EXPÉRIMENTAUX	
IV - <u>ÉTUDE CHRONOLOGIQUE DES PRINCIPAUX STADES DE LA ANAPHYLAXIE</u>	16
De la phase de sensibilisation à la phase de réaction. Mouvement ciliaire. Mécanisme de l'arrêt et de la réaction.	
V - <u>ÉTUDE HISTOLOGIQUE DE LA RÉACTION ANAPHYLACTIQUE DE LA NASALE</u>	21
Techniques de prélèvement et de fixation. Coloration- fixation et coloration. Les altérations tissulaires. Pénétration et distribution des antigènes particulaires. Conséquences. Modifications tissulaires.	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550208_0024

S O M M A I R E

		<u>Pages</u>
I	- <u>INTRODUCTION</u>	1
	Définition. Modèles expérimentaux mis au point. Problèmes posés à propos de la pénétration des antigènes particuliers dans la muqueuse nasale.	
II	- <u>RAPPEL DE LA STRUCTURE HISTOLOGIQUE DE LA MUQUEUSE NASALE</u>	4
	Le cil vibratile. Rappel des notions physiologi- ques concernant la muqueuse nasale. Le battement ciliaire. L'absorption des particules inhalées.	
III	- <u>MATERIEL ET METHODES</u>	11
	Le pollen de <i>Betula alba</i> . Technique de sensibilisa- tion des animaux de laboratoire. Méthodes d'étude de l'anaphylaxie nasale expérimentale.	
IV	- <u>ETUDE CHRONOLOGIQUE DES PREMIERS STADES DU CHOC ANAPHYLACTIQUE</u>	16
	De la première à la dixième minute. Arrêt du mouvement ciliaire. Méthodes <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .	
V	- <u>ETUDE HISTOLOGIQUE EN MICROSCOPIE OPTIQUE DE LA MUQUEUSE NASALE SOUMISE A L'INSTILLATION D'ANTIGENES PARTICULAIRES</u>	21
	Techniques de prélèvement et de fixation. Décalci- fication et coloration. Les altérations tissulaires. Pénétration et durée de cette pénétration des anti- gènes particuliers jusqu'au contact de la sous- muqueuse. Modifications cellulaires.	

		<u>Pages</u>
VI	- <u>MICROSCOPIE ELECTRONIQUE. ETUDE CHRONOLOGIQUE (AU DELA DE LA DIXIEME MINUTE)</u>	36
	Technique de repérage des antigènes instillés au contact de la muqueuse.	
	Etude cytologique :	
	. après une heure de contact entre grain de pollen et muqueuse sensibilisée - comparaison avec les données de l'histologie optique - rôle des cellules éosinophiles - anatomie des pores polliniques . après vingt heures de contact . après trois jours de contact . après cinq jours de contact . après sept jours de contact . après dix et onze jours de contact . après quinze jours de contact . après vingt-sept jours de contact	
VII	- <u>LE MODELE EXPERIMENTAL A ANTIGENE FIXE ET DEVENIR DES ANTIGENES POLLINIQUES.....</u>	57
VIII	- <u>ETUDE DU COMPORTEMENT DES GRAINS DE POLLEN EN CHAMBRE DE CULTURE</u>	62
	Les réactions de précipitations en milieux contenant de l'anti-sérum.	

IX	-	<u>CORRELATION ENTRE LES TESTS IMMUNOLOGIQUES</u>	68
		Test d'Ovary. Transmission passive de l'anaphylaxie dans le domaine de la muqueuse nasale.	
X	-	<u>MISE AU POINT ET ETUDE D'UN "POLLEN ARTIFICIEL".</u>	72
		Conditions générales nécessaires au substrat du pollen artificiel. La résine échangeuse d'ions. La pénétration intra-muqueuse de la résine.	
XI	-	<u>MISE EN EVIDENCE D'UNE FRACTION DE L'ANTIGENE POLLINIQUE RESPONSABLE DU PHENOMENE DE DESTRUCTIONS CELLULAIRES ABOUTISSANT A LA PENETRATION INTRA-MUQUEUSE</u>	77
		Etudes préliminaires : la cinétique de l'extraction ; conditions physico-chimiques de l'extraction ; essais de fractionnement biochimique. Expériences visant à isoler une ou plusieurs fractions actives.	
XII	-	<u>COMPARAISON DES ALTERATIONS CYTOLOGIQUES PROVOQUEES PAR LA RESINE VECTRICE D'ANTIGENE ET LE POLLEN</u>	93
XIII	-	<u>ESSAI NEGATIF DE GENERALISATION D'EMPLOI DE LA RESINE COMME "POLLEN ARTIFICIEL"</u>	97
		L'immunoglobuline G. Etude en immunofluorescence. Recherche des antigènes. Etude au microscope électronique des résines supposées vectrices d'I.G.G. Dosages biologiques de l'adsorption d'I.G.G. par la résine.	

		<u>Pages</u>
XIV	- <u>ETUDE D'UN AUTRE "POLLEN ARTIFICIEL" OU VECTEUR D'ANTIGENES</u>	108
	Définition ; étude au microscope électronique. Valeur de ce modèle expérimental.	
XV	- <u>L'AUTONOMIE IMMUNOLOGIQUE DE LA MUQUEUSE NASALE</u>	117
XVI	- <u>MECANISME DE LA DESTRUCTION CELLULAIRE</u>	121
	Le complément. L'action de l'E.D.T.A. sur la muqueuse nasale. Etude expérimentale.	
XVII	- <u>CONCLUSIONS</u>	129
	Valeur des modèles proposés dans l'étude de l'anaphylaxie nasale.	
XVIII	- <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	133

§ §
§

L'ANAPHYLAXIE NASALE

ETUDE DE MODELES EXPERIMENTAUX

INTRODUCTION

Le choix de l'anaphylaxie nasale comme sujet d'étude expérimentale appelle quelques remarques. Tout d'abord, les phénomènes définissant ou accompagnant l'anaphylaxie sur le plan cellulaire sont encore très imparfaitement connus, ceci est particulièrement évident en ce qui concerne l'épithélium des voies aériennes supérieures qui constitue pourtant chez l'homme, comme chez tous les mammifères, le lieu d'impact de tous les allergènes véhiculés par voie aérienne (ou pneumallergènes). Sous cet angle, le classique rhume des foins, ou plus généralement la "pollinose", peut être considérée comme le type même de ces manifestations allergiques dont la fréquence est très grande. Or, si l'on connaît bien, sur le plan expérimental, les manifestations, spécialement cutanées et sérologiques, de l'anaphylaxie, et ce depuis fort longtemps (RICHET C.H. 1902 - ARTHUS M. 1921 - BORDET J. 1921), si les tests cutanés destinés à dépister ces manifestations sont entrés dans le domaine clinique journalier, il est, en revanche, surprenant de constater le manque de documents expérimentaux précis concernant l'anaphylaxie nasale. Nous avons étudié, sous ce terme, les altérations cellulaires, qui se développent avec une extrême rapidité lorsqu'un antigène est mis en contact avec une muqueuse sensibilisée, ainsi que les phénomènes biologiques, de valeur générale, notamment sérologique, qui découlent d'un tel contact.

Notre étude a porté tout d'abord, en raison de leur caractère exemplaire, sur les modifications cellulaires résultant de la pollinose; nous avons ensuite tenté de réaliser des modèles expérimentaux, moins complexes que ceux constitués par les pollens, en utilisant, d'une part, une résine de polystyrène calibrée adsorbant l'antigène et, d'autre part, des globules rouges porteurs d'antigène, unis à ce support par une liaison covalente. Ces différents antigènes particuliers nous ont fourni des résultats très semblables, ce qui démontre l'unité des réactions cellulaires de la muqueuse nasale et la possibilité, en dépit de la complexité de ces réactions, de les étudier à l'aide de modèles expérimentaux relativement simples.

Compte tenu de l'activité physiologique, très spécialisée, de l'épithélium cilié de la muqueuse nasale et des voies aériennes supérieures, dont un des rôles essentiels, nous le verrons, est d'évacuer rapidement vers les choanes toutes les particules qui pénètrent dans la filière nasale, étant donné, également, les dimensions importantes de l'antigène représenté par le pollen (ou par nos modèles expérimentaux), un certain nombre de questions ne peuvent manquer d'être posées, en particulier :

- 1 - Comment est-il possible que des grains de pollen (ou tous autres antigènes de masse comparable) puissent sensibiliser l'homme ou l'animal d'expérience, alors que le mouvement ciliaire normal balaie, en quelques huit à dix minutes, toutes les particules inhalées ?
- 2 - En admettant que ces antigènes puissent parvenir au contact des cellules épithéliales, comment s'effectue la sensibilisation, non seulement locale mais également générale ? (Cette dernière est certaine, puisqu'on sait que le diagnostic de telles allergies se fait cliniquement par l'étude des réactions cutanées du sujet sensibilisé) .

- 3 - Quelles sont les lignées cellulaires impliquées dans la chaîne de transformations qui, à partir des constituants complexes de l'antigène, aboutissent à la formation d'immuno-globulines ?
- 4 - Quel est le mécanisme des destructions cellulaires, extrêmement rapides, que l'on constate cytologiquement lorsque le complexe antigène-anticorps est constitué au contact des cellules de l'épithélium nasal sensibilisé ?

Toutes ces questions sont essentielles, car elles appréhendent le problème de l'anaphylaxie nasale aux premiers stades de son développement et ces premiers stades sont eux-mêmes responsables de la longue suite des réactions qui durent toute la vie chez un individu sensibilisé.

Les grands traités classiques concernant l'allergie nasale, tel par exemple, celui de FRENCH K. NANSEL (1936), éludent ces questions ou ne fournissent que des réponses dont le caractère *a priori* est évident. Cet auteur déclare, notamment, que les pollens qui parviennent au contact de la muqueuse nasale, sont enrobés dans le mucus et que, par dilution de la fraction active de leurs composants protéiques, ils deviennent capables de provoquer les phénomènes de sensibilisation générale. Que cette explication, qu'aucune preuve expérimentale n'étaye, ne puisse être tenue pour satisfaisante, résulte de nos connaissances concernant l'anatomie et la physiologie de la muqueuse des voies aériennes supérieures.

STRUCTURE HISTOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIE
DE LA MUQUEUSE NASALE

(rappel)

Histologiquement, toutes les muqueuses des voies aériennes supérieures, chez les mammifères, sont constituées par un épithélium de type cylindrique cilié. Les cils sont implantés, en nombre très variable, au niveau de la surface libre de chaque cellule. L'unité de toutes les structures ciliaires est parfaitement établie, grâce, avant tout, aux études de microscopie électronique. Cette unité anatomique résulte essentiellement de l'aspect qu'offrent tous les cils en coupe transversale (photo 1).

Au centre, le cil comporte deux fibres circulaires à la coupe, chacune mesure environ deux cent quarante angströms de diamètre. Ces fibres ne sont pas accolées mais reliées entre elles par une zone dense. A la périphérie du cil se trouvent neuf doubles fibres, de section légèrement ovalaire, d'un diamètre de trois cents angströms sur deux cent soixante angströms (ce sont les "doublets" des auteurs anglo-saxons). Elles sont subdivisées en fibres A et B, la fibre A est la plus proche du centre et porte deux courtes projections, denses aux électrons, qui sont les "bras". L'arrangement de ces prolongements, qui rendent le cil asymétrique en ce qui concerne sa structure interne, a permis de donner un ordre à chacun des doublets périphériques (AFZELIUS R., 1959). L'ensemble est entouré d'une double membrane, de structure semblable aux membranes cytoplasmiques.

Il convient de noter que les structures longitudinales sont beaucoup moins bien définies que celles qui résultent de l'analyse des coupes transversales (FAWCETT D.T. et PORTER K.R., 1954; GIBBONS I.B., 1961).

Les structures basales du cil ont également été étudiées sur des coupes transversales. Après une zone de transition (très complexe), située au niveau de son implantation intra-cellulaire, le cil se continue, sans rupture de continuité, dans le corpuscule basal (cette structure est celle de tous les centrosomes) ; il est cylindrique, d'une longueur de 0,35 micron, d'un diamètre d'environ 0,22 micron, il limite neuf fibres qui apparaissent, non plus comme des doublets mais comme des triplets formés chacun de trois fibrilles. La fibrille la plus externe ne se poursuit pas en dehors du corpuscule basal, les deux autres se continuent dans le cil pour former les "doublets" périphériques (GIBBONS I.B., 1961). Il est à noter que, par rapport au nombre de cils, il semble bien que les corpuscules basaux soient en surnombre ; certains ne portent pas de cils et sont isolés dans le cytoplasme. Cette structure centrosomique semble être responsable de la constitution des cils vibratiles.

Outre les structures ciliées, l'épithélium des voies aériennes supérieures offre, en nombre variable, des cellules sécrétrices, de type caliciforme. Leur nombre varie en fonction des zones de la muqueuse et de l'état physiologique de l'animal. On admet, d'ailleurs, qu'elles peuvent provenir de cellules ciliées modifiées. Elles sont, en effet, plus abondantes que normalement dans les muqueuses sensibilisées. Conjointement avec les cellules séro-muqueuses, situées plus profondément au niveau de la sous-muqueuse, ces cellules glandulaires assurent, par leurs sécrétions, la permanence du film de mucus qui recouvre toute la surface muqueuse. Le complexe "cils vibratiles-mucus" est indissociable. En particulier, les constantes physico-chimiques du mucus conditionnent étroitement l'efficacité du mouvement ciliaire.

Sous le revêtement superficiel constitué par la première couche cellulaire, se trouve une zone de deux ou trois couches de cellules qui donnent à l'ensemble un aspect stratifié et qui sont des cellules jeunes. La muqueuse des voies aériennes supérieures desquame normalement, à un rythme plus ou moins rapide suivant les facteurs irritatifs auxquels elle est soumise (tabac, poussière etc...).

Ces cellules remplacent immédiatement et prennent le rôle des cellules de recouvrement qui disparaissent. Sous cette zone, existe généralement une membrane basale comportant une assise, d'épaisseur variable, formée de fibres collagènes. Notons que chez le cobaye, notre principal animal d'expérience, cette membrane basale manque le plus souvent. Sous ce dernier plan, enfin, la sous-muqueuse, essentiellement constituée de tissu fibro-conjonctif lâche, enserme les glandes acineuses séro-muqueuses et entoure les vaisseaux particulièrement nombreux, notamment au niveau des zones érectiles. Ces dernières, très caractéristiques chez l'homme et certains mammifères, n'existent pas chez les rongeurs. Les terminaisons nerveuses sont, essentiellement, constituées de rameaux péri-vasculaires, de valeur neuro-végétative, qui accompagnent les vaisseaux.

Il résulte de ces dispositions anatomiques que, lors du déroulement de la phase initiale du choc anaphylactique, aucun élément vasculaire, non plus qu'aucune terminaison nerveuse, ne saurait être directement intéressé, puisque ces structures demeurent sous-jacentes à l'épithélium cilié.

Ce rappel anatomique a pour but de servir d'introduction à l'étude de la physiologie de la muqueuse nasale, ou plus généralement de celle des voies aériennes supérieures. Cette muqueuse assume un triple rôle, d'importance vitale : humidifier, réchauffer l'air inspiré et protéger les alvéoles pulmonaires de toutes particules inhalées. Normalement, même en atmosphère polluée, l'air qui parvient dans la trachée et les alvéoles pulmonaires est, non seulement stérile, mais réchauffé aux environs de 35° et saturé d'eau. Il suffit de considérer un instant les conditions de vie de l'homme moderne dans les grandes cités pour reconnaître la perfection et la robustesse de ces mécanismes. C'est donc le mécanisme de l'arrêt, puis de l'évacuation, des particules inhalées qui importe dans l'étude de l'anaphylaxie nasale. Sous cet angle, le nez

fonctionne de façon assez comparable à certains dépoussiéreurs industriels qui agissent par turbulence et dans lesquels les poussières à éliminer sont projetées sur les parois par des courants d'air convenablement dirigés. L'air, pénétrant normalement dans les narines, rencontre, tout d'abord, le rétrécissement ovalaire du vestibule nasal qui, fonctionnant comme un ajutage de Venturi, provoque à la fois une accélération et une turbulence du courant d'air inspiré. Cet air pénètre ensuite dans la filière des fosses nasales où sa turbulence s'amplifie encore du fait des irrégularités considérables de la paroi externe (les cornets) et du caractère lisse de la paroi du septum. Ce caractère est particulièrement accusé chez les rongeurs tels que les cobayes ; leurs cornets présentent, en effet, une structure feuilletée, la rigidité de chaque repli de la muqueuse étant assurée par une très mince lamelle osseuse. Le réchauffement et l'humidification de l'air inspiré sont ainsi assurés par la très grande surface de muqueuse qui entre en contact avec l'air (chez l'homme et les anthropomorphes, au contraire, c'est le jeu réflexe des corps érectiles des cornets qui assure, par un mécanisme différent, ces mêmes fonctions de réchauffement et d'humidification).

On conçoit, dans ces conditions, comment à chaque inspiration les multiples tourbillons d'air plaquent les particules inhalées sur le film de mucus qui recouvre la totalité de la muqueuse. Le mucus constitue un film, constamment renouvelé par les sécrétions glandulaires, et dont la viscosité doit demeurer constante ; tout accroissement de celle-ci, en effet, entrave immédiatement les battements ciliaires. A fortiori, la dessiccation entraîne un arrêt total des battements. Ce film offre une épaisseur suffisante pour recouvrir complètement les structures ciliées ; ces dernières le font mouvoir dans sa masse, comme un trottoir roulant, et dans une direction générale tendant, au niveau des fosses nasales, à se faire globalement d'avant en arrière, vers les choanes, alors qu'au niveau des bronches le mouvement tend à évacuer le tapis de mucus vers le pharynx, de telle sorte que les deux trajectoires se rejoignent au niveau du pharynx où le mucus est dégluti de façon réflexe.

En réalité, il s'agit là d'une schématisation quelque peu excessive. Il existe de très nombreux méandres, des zones où les mouvements se ralentissent, et le mouvement général que nous avons décrit, s'il est vrai dans l'ensemble, ne reflète absolument pas le désordre apparent qui semble régner lorsqu'on examine *in vivo* une muqueuse nasale au microscope chez un animal d'expérience, et qu'on s'efforce d'y suivre la progression de particules. Cette progression est, normalement, assez rapide puisqu'elle permet, chez l'homme, à une particule de masse convenable, déposée au tiers moyen du cornet inférieur, d'atteindre le pharynx en dix à douze minutes. Elle est sous la dépendance directe du battement ciliaire.

Normalement, ce battement, dont l'existence, sinon le rythme, est universelle, se décompose en deux temps successifs ; un premier temps, constitué par un mouvement rapide, représente la phase active et en marque le sens, un second, plus lent ou phase de rappel, qui ne joue aucun rôle direct de propulsion, mais permet au cil de revenir à son point de départ. Cette inégalité des deux phases du cycle conditionne, évidemment, l'efficacité du battement. Un fait ne semble pas avoir été noté par les auteurs qui ont étudié ce battement : c'est son premier signe d'altération qui n'est pas, comme on l'a écrit généralement, le ralentissement du mouvement, mais bien l'égalisation des deux phases du battement. Il est très facile de l'observer microscopiquement sur un fragment de muqueuse ciliée, nasale ou trachéale, placée *in vitro* dans des conditions optima de survie (en particulier, température, pH, osmolarité). Le battement devient, dès lors, inefficace, les particules en suspension dans la préparation sont animées d'un mouvement pendulaire qui les fait osciller, parfois rapidement, autour d'un point d'équilibre, mais qui ne les propulse plus.

Le rythme normal du battement ciliaire, c'est-à-dire le nombre de cycles décrits par l'extrémité libre du cil dans l'unité de temps (généralement, la minute), pose un problème qui n'est pas entièrement résolu et qui fait l'objet de notre second mémoire de thèse.

Nous avons insisté longuement sur les structures de l'épithélium cilié et sur la physiologie très spécialisée de cet épithélium, en raison du rôle essentiel que joue le "complexe cils vibratiles-mucus" dans la protection contre toutes particules inhalées. Ces particules, nous l'avons déjà dit, projetées, du fait de la turbulence du courant d'air inspiratoire, contre les parois, sont enrobées par le film de mucus dont la viscosité est grande, l'ensemble étant constamment propulsé par les battements ciliaires vers le pharynx. Ainsi se trouve posée la question de l'efficacité de cette première ligne de défense. Indiquons, d'emblée, que cette défense est totalement inefficace en ce qui concerne les solutions de sels minéraux ou, ce qui revient au même, vis-à-vis des substances qui sont susceptibles d'être solubilisées par le mucus nasal (lequel contient environ 40 % d'eau). C'est ainsi que BLUMGART H.L. (1924) a réussi à provoquer la mort de chiens et de chats en leur pulvérisant dans les narines un sel de plomb soluble dans le mucus. RICHTNER M.G. (1943) a montré, en utilisant une poudre de sulfamide, dont le dosage par fluorescence est possible au niveau du sérum de l'animal d'expérience, qu'après deux heures, il existait une pénétration peu importante, mais qu'au cours de la troisième heure, cette concentration doublait, ce qui implique une solubilisation progressive de la sulfamide utilisée. Cet auteur a de plus montré que la poudre instillée, en suspension liquide, pénétrait plus vite et de façon plus abondante à travers la muqueuse.

La possibilité d'immuniser des sujets par voie nasale est connue depuis longtemps. BLUMEAU L. (1911) vaccina des enfants contre la diphtérie par voie nasale, JENSEN C. (1937) puis BONSFIELD G. et KINGBROWN W.W. (1938) étudièrent également cette méthode et confirmèrent ses possibilités. Quant aux réactions anaphylactiques locales et générales à des protéines étrangères administrées par voie nasale, sous forme liquide ou facilement soluble, les études sont nombreuses. SAITO W. démontra, dès 1912, la possibilité d'obtenir une réaction de SHULZ-DALE positive après sensibilisation par voie nasale au moyen d'un extrait de poussières.

COHEN M.B. et coll. (1930), à l'aide d'extrait desséché de ragweed (*ambrosia*), démontrent la rapidité d'adsorption de l'antigène solubilisé. SIMON F.A. et RACHEMANN F.M. (1934) prouvent que l'on sensibilise aisément l'homme par un sérum d'animal. Plus précisément, CHAIT R.A. et WALZER M. (1950) effectuent au niveau de la muqueuse nasale de l'homme une sensibilisation passive locale et constatent une réaction positive en onze à treize minutes lorsque l'antigène liquide est mis au contact de la muqueuse. Rappelons, pour conclure, que le traitement classique du diabète insipide a longtemps consisté pour les malades à priser de la poudre d'hypophyse.

Cytologiquement, il importe de souligner la très grande abondance de prolongements protoplasmiques qui naissent de la surface cellulaire, entre l'implantation des cils vibratiles. Mais le problème qui nous intéresse essentiellement ici est de déterminer dans quelle mesure et jusqu'à quelle taille des particules inertes, non antigéniques, peuvent pénétrer au sein de l'épithélium nasal. Les travaux de HUBNER V. (1920), confirmés par ceux de KALLOS et PAGEL (1937), ont montré qu'aucune particule inerte d'une taille supérieure à cinq microns ne pouvait pénétrer dans la muqueuse et que seules des particules inhalées inférieures à cinq microns étaient susceptibles d'atteindre les alvéoles pulmonaires. Dès lors que la grande majorité des pollens dépassent, et de beaucoup, ces dimensions, dès lors qu'une expérience clinique très ancienne, confirmée par les données immunologiques plus récentes, nous apprend que ces pollens sont de très importants facteurs d'allergie nasale, de trachéobronchite allergique et d'asthme, il est évident que le problème est désormais de savoir par quel mécanisme ces antigènes aériens peuvent provoquer ces états de sensibilisations, non seulement locales mais générales, et par la suite déclencher avec une telle rapidité (l'unité de temps étant la minute) les classiques réactions qui définissent le choc anaphylactique.

MATERIEL ET METHODES

A l'inverse de la démarche expérimentale habituelle, nous avons été conduit, au cours de cette étude à simplifier progressivement nos modèles expérimentaux. Après étude des réactions provoquées par le pollen au contact de muqueuses sensibilisées, réactions d'une très grande complexité en raison de la nature de l'antigène, nous avons mis au point un "pollen artificiel" constitué par des sphères de polystyrène, de masse convenable et susceptibles d'adsorber des protéines antigéniques. Nous avons également utilisé, par analogie avec le matériel couramment employé dans les laboratoires d'immunologie, des globules rouges formolés, pouvant fixer par liaison chimique des antigènes bien déterminés et de haut poids moléculaire. L'unité fondamentale des réactions de la muqueuse nasale sensibilisée, en présence de ces différents vecteurs d'antigène a été constamment confirmée et s'est toujours traduite par un ensemble de destructions cellulaires, par la pénétration de l'antigène et par une séquence temporelle très précise de réactions cytologiques au voisinage de ce dernier.

Le pollen de bouleau

Le pollen de bouleau que nous avons utilisé de façon habituelle, est celui du bouleau argenté (*Betula alba*), en raison de la relative facilité de sa récolte et de son obtention à l'état pur. Il provenait de deux sources : du pollen frais récolté par nous-même et préparé dans notre laboratoire, du pollen desséché fourni par la firme DIEPHUIS à Groningue.

Il convient immédiatement de préciser que le pollen, qu'il soit desséché ou à l'état frais, s'est toujours comporté de façon identique. C'est dire qu'il est facteur de sensibilisation par la structure de ses protéines et non par le pouvoir germinatif qu'il peut assumer à l'état frais.

Nous avons utilisé :

- a) du pollen desséché industriellement et conservé plusieurs années à sec (DIEPHUIS) ;
- b) du pollen fraîchement récolté et conservé quelques trois à cinq semaines à 4° (conditions optima de conservation du pouvoir germinatif).

Ils se sont, l'un et l'autre comportés comme des allergènes, seule leur structure chimique étant en cause, en particulier aucune tendance au développement de stolons n'a été constatée *in vivo*. Le pollen de bouleau, comme tous les autres pollens, possède un noyau germinatif et un noyau végétatif. Son aspect et ses dimensions sont fixes, il dessine un ovoïde légèrement aplati sur une de ses faces, il possède trois pores et les lignes qui relient ces pores délimitent un triangle isocèle inscrit dans le contour pollinique. Il mesure vingt neuf microns dans son petit axe et trente deux microns dans son grand axe. Soulignons que ce sont là des dimensions très supérieures à celles que possèdent, normalement, les corps susceptibles de franchir la barrière épithéliale (photos n° 4 et n°5).

Lorsque le pollen fut utilisé comme antigène (ce qui fut le cas pour la majorité des animaux), la sensibilisation fut réalisée par injection, soit d'une solution d'extrait aqueux de pollen, soit d'une solution provenant du broyage des grains de pollen. Dans les deux cas, l'adjuvant de Freund complet fut utilisé, soit celui fourni par la Firme DIFCO, soit celui préparé par nos soins et répondant à la même formule.

La préparation de la solution aqueuse est obtenue en mettant en contact dix milligrammes de pollen desséché pour un millilitre d'eau bidistillée. L'extraction est poursuivie durant trente minutes à une heure, à la température du laboratoire, puis la suspension est filtrée sur papier.

La préparation de la deuxième solution est réalisée par microbroyage durant vingt minutes, en s'assurant que la température ne dépasse pas 40°. La suspension est utilisée sans filtration (en fait, l'examen au microscope révèle qu'en raison de leur consistance extrêmement dure une très notable proportion des coques polliniques échappent à l'action du broyage). L'important est de s'assurer que chaque millilitre injecté contient, au minimum, un milligramme de protéine de pollen.

Technique de sensibilisation des animaux d'expérience

En règle générale, les animaux furent sensibilisés selon la technique suivante :

- une injection d'un millilitre (composé de 0,5 ml. de la solution ou suspension antigénique et de 0,5 ml. de l'adjuvant de Freund) par voie intra-musculaire, tous les quatre jours, au total cinq injections sont pratiquées

- entre la troisième et la quatrième de ces injections, les animaux reçoivent, à raison d'une fois par jour, des instillations nasales d'extrait aqueux de pollen sans adjuvant de Freund (à raison de dix milligrammes de pollen desséché pour deux millilitres et demi d'eau distillée). Il est évident que s'agissant d'instillation nasale, il est impossible ici de savoir exactement la dose administrée

- après un intervalle libre de quinze à dix-huit jours, les animaux sont soumis à une cinquième injection de rappel, semblable aux injections précédentes, accompagnée d'une instillation d'antigène

- quatre jours plus tard et dans un délai variant, nous le verrons, de dix minutes à vingt-sept jours avant le sacrifice, les animaux furent soumis, soit à une pulvérisation de pollen desséché, soit à une instillation d'une suspension de pollen broyé et filtré dans l'eau physiologique (cette dernière ne sert que de vecteur destiné à faciliter l'administration intra-nasale et le pollen n'est mélangé à elle que quelques minutes avant l'instillation pour éviter, autant que possible, de solubiliser les fractions antigéniques).

Nous avons, au total, sensibilisé cinquante-neuf séries d'animaux, chaque série comprenant de quatre à dix cobayes ou lapins. La mortalité totale, avant sacrifice, qui fut d'environ 15 %, peut paraître importante : elle n'est, en général, pas le fait des injections d'antigène, mais de leur instillation nasale. Les animaux d'expérience sont, en effet, très sensibles aux rhinites infectieuses, difficilement évitables, qui déterminent de redoutables épidémies de clapier.

Une variante de ces méthodes mixtes de sensibilisation, par voie générale et voie nasale combinées, consiste à pratiquer une sensibilisation uniquement par voie nasale en instillant un broyat de pollen filtré, repris par de l'eau physiologique, à raison de deux instillations par jour, durant six à huit jours. Après un intervalle libre de trois semaines, on pratique une instillation de rappel et, trois à cinq jours plus tard, la pulvérisation intra-nasale déclenchante de pollen sec. Cette méthode de sensibilisation qui peut, à bon droit, être considérée comme la plus proche de celle qui aboutit chez l'homme à la constitution des diverses "pneumallergies", nous a fourni des résultats comparables à la méthode de sensibilisation précédente.

Comme témoins de ces différentes méthodes de sensibilisation, nous avons utilisé des animaux normaux auxquels fut administrée, immédiatement avant de les sacrifier, une seule pulvérisation de pollen sec par voie nasale. Cette pulvérisation fut toujours importante (de l'ordre d'un milligramme de pollen sec), mais il est difficile, étant donné le mode d'administration, d'en déterminer la dose exacte.

Etude expérimentale de l'anaphylaxie nasale

Afin d'aborder les différents problèmes posés par le contact entre allergènes (pollens) et muqueuse nasale sensibilisée, plusieurs méthodes furent mises en oeuvre. Contentons-nous de les énumérer ci-dessous, les détails expérimentaux trouvant place en chacun des chapitres ainsi définis :

1) observation *in vivo* et *in vitro* du mouvement ciliaire au cours du choc anaphylactique expérimental. Dans le cas d'observation *in vitro*, l'expérimentation fut effectuée au niveau de fragments de muqueuse nasale placée, immédiatement après sacrifice de l'animal, dans les meilleures conditions de survie. ;

2) étude histologique et histochimique en microscopie optique de la muqueuse soumise *in vivo* au contact de l'allergène ;

3) étude cytologique en microscopie électronique des modifications cellulaires provoquées par le contact de l'allergène en fonction du temps de contact ;

4) mise au point d'une méthode d'étude de fractions immunologiquement actives, grâce à l'emploi d'un "pollen artificiel" constitué par une résine échangeuse d'ions ;

5) étude du devenir des antigènes au niveau de la muqueuse nasale, étude effectuée par l'utilisation, en microscopie optique, de la méthode d'immunofluorescence ;

6) dans le même but, étude en microscopie électronique, de la ferritine utilisée, après adsorption sur des globules rouges aviaires, comme traceur des réactions anaphylactiques locales.

LES PREMIERS STADES DU CHOC ANAPHYLACTIQUE

Deux faits, d'observation absolument constante, caractérisent le contact d'un antigène (pollen dans le cas particulier, mais ceci est également vrai pour tous les antigènes particuliers) avec une muqueuse nasale sensibilisée à cet antigène :

a) le mouvement ciliaire normal cesse rapidement, en quelques minutes, lorsque la muqueuse est convenablement sensibilisée (en fait, nous verrons même, ultérieurement, que les cils ne sont pas seulement immobilisés, mais détruits par le choc anaphylactique)

b) les grains de pollen (ou, plus généralement, toute particule antigénique de masse convenable) cessent alors d'être propulsés et s'enfoncent dans la mince couche de mucus sur laquelle ils reposaient. Ils parviennent ainsi au contact des cellules épithéliales et pénètrent au sein de la muqueuse.

Arrêt du mouvement ciliaire

L'arrêt du mouvement ciliaire constitue donc, chronologiquement, le premier phénomène observable, traduisant histologiquement la réaction entre antigène et muqueuse sensibilisée. Considéré sous cet angle, il est certain que cet arrêt conditionne tous les développements ultérieurs de la crise locale d'anaphylaxie. En d'autres termes, si le maintien du mouvement ciliaire normal pouvait être assuré en de telles conditions expérimentales, l'animal serait, dans une large mesure, protégé.

Le rhume des foins est connu cliniquement depuis le XVIIIème siècle et pourtant la constatation de ce phénomène primordial n'a été faite que relativement récemment (STRÖMME O., 1952 ; CHEVANCE L.G., 1954). Ceci s'explique, probablement, en raison de la rapidité de son évolution, puisqu'en quelques minutes le mouvement ciliaire cesse ; l'étude suppose donc une observation *in vivo* du phénomène. Cet arrêt (qui, nous le verrons, est en fait conditionné par une destruction totale, mais limitée dans l'espace, des structures ciliées) est surprenant si l'on considère la remarquable résistance du mouvement ciliaire en présence, par exemple, de conditions aussi défavorables que celles provoquées par une suppuration sinusienne chronique.

PROETZ A.W. (1941) et HILDING A.C. (1961) ont signalé que les muqueuses opératoirement prélevées au cours d'interventions pour sinusites chroniques (muqueuses évidemment altérées par l'infection) possédaient encore des îlots de muqueuse ciliée dont le battement était apparemment normal. Signalons, à titre purement comparatif, que l'arrêt du mouvement ciliaire par choc anaphylactique se produit dans le même laps de temps que celui constaté lors d'instillation d'une solution à 10 % de chlorhydrate de cocaïne sur la muqueuse de mammifères.

Les méthodes d'étude de ce phénomène se confondent avec les différentes techniques proposées pour l'analyse du mouvement ciliaire. Il serait hors de propos ici de les résumer toutes, nous nous bornerons à indiquer celles que nous avons utilisées. Chez les mammifères de laboratoire, ces techniques peuvent être classées en techniques d'étude *in vivo* et d'étude *in vitro*.

ETUDE *in vivo*

In vivo, le mouvement ciliaire peut être observé grâce à l'emploi d'un ultropak. L'animal étant anesthésié (10 cc./kg. d'uréthane à 1 % par voie intrapéritonéale), le massif des os propres du nez est disséqué d'un seul côté et sur une surface de deux centimètres carrés environ. Le seul temps opératoire délicat est celui du décollement, au moyen du décolleur mousse courbe, de la muqueuse qui double les structures à leur surface profonde, ceci afin d'éviter au maximum le saignement interne au niveau de la filière nasale. Le manchon de muqueuse intacte est ensuite excisé au thermocautère (toujours dans le but d'éliminer le risque d'hémorragie). La muqueuse nasale étant ainsi exposée, le système optique (généralement un ultropak) est mis au point sur une zone précise, habituellement le bord libre convexe du cornet inférieur. Cette méthode permet, sous un grossissement d'environ cent vingt à cent cinquante diamètres, l'observation directe *in vivo* du mouvement ciliaire. Mais il s'agit là, évidemment, d'une vue globale qui, en raison des limites de grossissement utilisable, n'autorise pas l'examen des cils.

La réalité du mouvement ciliaire est révélée par l'agitation du mucus, elle est nettement visible au niveau des plages lumineuses déterminées par la réflexion de l'éclairage épiscopique. En étudiant un animal témoin, non sensibilisé, on constate que les grains de pollen projetés en faible quantité sur la surface du mucus y demeurent nettement visibles, puis sont assez rapidement entraînés hors du champ d'observation microscopique. La vitesse de translation chez le cobaye, en ces conditions expérimentales, était de quatre à six millimètres par minute. Insistons sur le fait que les grains de pollen n'ont à aucun moment tendance à s'enfoncer au sein du mucus visqueux qui, à la fois, les supporte et les transporte.

En répétant cette expérience sur un animal sensibilisé, on constate que, durant les deux à trois premières minutes d'observation, tout se passe comme précédemment, mais très vite le mouvement régulier de translation des grains se ralentit pour cesser en cinq à six minutes environ. Parallèlement, on observe un arrêt de la cavitation du mucus qui révèle le mouvement ciliaire. Cet arrêt se fait "en tache d'huile" autour de chaque grain, lorsque ceux-ci sont espacés suffisamment. Cette zone d'arrêt couvre un cercle d'environ cinquante microns de rayon autour de chacun de ces grains. Dans le même temps où se produit cet arrêt, le grain de pollen s'enfonce dans la mince couche de mucus qui, rappelons-le, non seulement recouvre les cils, mais encore dépasse leur extrémité libre. En raison de leur volume, les grains demeurent encore visibles, mais beaucoup moins nettement que lors de l'expérience précédente ; ils vont, dès lors, parvenir au contact de la surface cellulaire et les altérations cytologiques, qui sont la traduction locale du choc anaphylactique, vont se produire de façon véritablement explosive.

La méthode qui consiste à étudier *in vivo* ces phénomènes initiaux du choc anaphylactique s'avère indispensable à titre de contrôle, mais elle se heurte à certaines difficultés. Elle nécessite, non seulement une dissection minutieuse - une hémorragie de quelque importance au niveau de la filière nasale rendant impossible l'observation - mais elle exige encore la mise au point du système optique (ultropak monté sur pied articulé) qui n'est pas toujours rapide ni facile, même si la tête de l'animal est étroitement maintenue. Enfin, et surtout, du fait de l'évaporation, due aux conditions anormales de fonctionnement du nez de l'animal d'expérience et à la chaleur de l'éclairage nécessaire, l'observation ne peut être poursuivie très longtemps, car la déshydratation, même relative, est le facteur capital d'altération du mouvement ciliaire ; nous avons déjà insisté sur ce fait.

ETUDE *in vitro*

Nous avons vérifié que l'étude *in vitro* d'un fragment de muqueuse, prélevé immédiatement après sacrifice de l'animal, permettait d'observer les phénomènes précédents avec des résultats identiques, et ceci beaucoup plus aisément. La multiplicité des contrôles possibles et l'emploi d'optiques fournissant de plus forts grossissements, grâce à l'emploi de cellules du type Malassez ou mieux, des chambres de culture du type Sykes-Moore, sont en effet des avantages certains. Pour mener cette étude, il convient avant tout de s'assurer de l'existence d'un battement ciliaire normal, ce qui est particulièrement aisé au niveau des bords libres de la préparation, car les cils vibratiles y sont visibles individuellement et propulsent vigoureusement de nombreuses particules ou cellules libres, en particulier des globules rouges. Lorsque les grains de pollen sont projetés sur la surface d'une muqueuse provenant d'animaux sensibilisés, un arrêt total des cils se produit en une dizaine de minutes. Cet arrêt débute au voisinage du point d'impact de chaque grain ; il est parfois possible de constater, ensuite, la destruction des cils qui se détachent de la surface cellulaire et disparaissent rapidement. Les fragments de muqueuse provenant d'animaux témoins demeurent normaux.

Le fait que ces phénomènes soient reproductibles, aussi bien au niveau d'un fragment de muqueuse qu'au niveau d'îlots cellulaires ciliés obtenus par grattage de la surface muqueuse et placés dans un liquide de culture (tel le liquide de Eagle, par exemple), prouve qu'ils sont bien la traduction cytologique de la réaction antigène-anticorps et qu'aucun élément extra-cellulaire (en particulier vasculaire ou nerveux) n'est nécessaire à leur expression.

ETUDE HISTOLOGIQUE EN MICROSCOPIE OPTIQUE

L'étude des phénomènes qui, ultérieurement, caractériseront chronologiquement le choc anaphylactique nasal, c'est-à-dire ceux qui se produisent au-delà de la dixième minute environ après instillation de l'antigène, nécessite non plus l'observation microscopique *in vivo*, mais le recours aux techniques histologiques. Nous avons utilisé les techniques classiques de la microscopie optique, nous n'insisterons que sur les techniques de prélèvement et de fixation employées.

Techniques de prélèvement et de fixation

L'expérience nous a démontré la nécessité de prélever l'ensemble du massif nasal des animaux d'expérience. En effet, la dissection de la muqueuse nasale n'est aisée qu'au niveau du septum, ce qui oblige à renoncer à l'observation des phénomènes pouvant se produire au niveau des parois latérales du nez, c'est-à-dire au niveau des cornets et des parois sinusiennes. De plus, étant donné sa minceur et sa rétractilité, la muqueuse nasale a tendance à s'enrouler sur elle-même dès qu'elle est détachée des plans résistants sous-jacents, rendant ainsi son orientation particulièrement difficile. Ces raisons nous ont conduit à prélever, de façon constante, l'ensemble du nez et des structures osseuses qui le soutiennent, c'est-à-dire l'os propre du nez et la voûte palatine. Ces prélèvements furent fixés selon deux techniques .

- Soit après perfusion vitale par voie aortique de l'animal, préalablement anesthésié à l'uréthane ou au nembutal et dont la masse sanguine est éliminée par lavage au sérum physiologique tiède ;

- soit par fixation locale, par simple instillation d'environ un millilitre du liquide fixateur dans chaque narine de l'animal anesthésié, suivie immédiatement de la décapitation et de la dissection du massif facial.

La qualité de la fixation des plans superficiels de l'épithélium est comparable d'une technique à l'autre.

Décalcification et coloration

La décalcification marque un temps important. Les cobayes (comme tous les rongeurs) possèdent des incisives dont les racines décrivent un arc de cercle qui suit sur les 3/4 de sa longueur le plan du palais dur et ces racines dentaires, du fait de leur structure, sont particulièrement longues à décalcifier.

Pour une étude morphologique, nous avons adopté la décalcification classique en utilisant une solution d'acide nitrique à 5 %, renouvelée toutes les quarante-huit heures, la décalcification ne demandant alors qu'environ quatre à cinq jours. Pour des recherches d'ordre histochimique, nous avons décalcifié les prélèvements en employant une solution d'acide éthylène diamine tétracétique à saturation dans l'eau distillée et amenée à pH 7,4 par la lessive de soude ; la solution renferme, dès lors, 12 % d'acide éthylène diamine tétracétique. Une telle méthode de décalcification permet de conserver au maximum les structures chimiques et même enzymatiques des prélèvements (CHEVANCE L.G. 1960, BALOGH K. 1965). Elle présente l'avantage évident de

permettre la décalcification du matériel à un pH physiologique (ou, plus généralement, à tout pH considéré comme optimum par l'expérimentateur), mais elle a, toutefois, l'inconvénient de nécessiter une plus longue durée de décalcification (douze à quinze jours, suivant l'importance du prélèvement). Il importe, en outre, la réaction étant de nature stoechiométrique, de renouveler tous les jours (ou tous les deux jours) la solution décalcifiante.

L'étude purement morphologique du phénomène, après fixation et décalcification telles que nous venons de les décrire, a fait appel à l'emploi de colorations signalétiques classiques : hémalun, picro-indigo-carmin ou trichrome rapide utilisant la trioxyhématéine ferrique, d'après la méthode de Gabe ; plus rarement, nous avons utilisé la coloration dite à l'azan.

Nous décrirons les phénomènes histologiques dans leur ordre chronologique, tel qu'on peut le reconstituer à partir du moment où, après arrêt du mouvement ciliaire, le grain entre en contact avec la surface muqueuse dont les structures ciliaires sont déjà détruites ou en voie de destruction. Deux manifestations histologiques caractérisent cette phase du choc anaphylactique : tout d'abord, la disparition totale de la bordure ciliée, puis la pénétration du grain de pollen au sein de la muqueuse.

La destruction complète des structures ciliées se produit avec une extrême rapidité au niveau de la zone de la surface muqueuse centrée par le grain de pollen. Ce phénomène est étroitement lié à celui de l'arrêt et, très probablement, sans rupture de continuité entre eux, la destruction suivant immédiatement l'arrêt. Cette destruction est un phénomène constant, jamais un grain de pollen ne peut être enchâssé dans la muqueuse sans que cette dernière perde ses structures ciliées. Cette constatation constitue un excellent test de la réalité du choc anaphylactique chez les animaux d'expérience. La destruction est assez limitée en surface si le point d'impact est isolé, de sorte que les zones

détruites ne sont pas confluentes. La zone de destruction a, en moyenne, un rayon voisin de cinquante microns. Cette donnée fut précisée, ultérieurement, par l'étude au microscope électronique. La zone de destruction est toujours très nettement tranchée ; en particulier, la périphérie ne comporte aucune zone de transition d'une cellule altérée à la cellule voisine, plus éloignée du point d'impact et dont la bordure ciliée apparaît normale.

L'étude en microscopie optique ne permet pas de répondre avec certitude aux différentes questions qui ne peuvent manquer d'être posées au sujet de la morphologie des cils en voie de lyse et, notamment, à la question de savoir si les corpuscules basaux sont intéressés par cette destruction. Ceci revêt une grande importance étant donné que ces structures conditionnent la reconstitution des cils détruits (HILDING A.G. 1966). De même, la nature exacte des altérations subies par les cellules est difficile à préciser en microscopie optique. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous avons toujours tenté de corroborer les renseignements fournis par la microscopie optique par ceux qui pourraient être obtenus par l'étude en microscopie électronique.

Les altérations tissulaires en microscopie optique

Au premier stade des altérations de la muqueuse apparaît une bulle d'oedème qui va cliver cette muqueuse. Cet aspect est rarement observé car il faut, en effet, que la concentration de pollen ne soit pas trop forte ; il faut également, que la fixation soit particulièrement précoce après l'instillation. Les meilleures images obtenues l'ont été sur des animaux dont la muqueuse fut fixée *in vivo*, cinq à dix minutes après l'instillation déclenchante. D'autre part, si la formation de cette bulle d'oedème est certainement très rapide, sa durée s'avère très éphémère. Elle éclate dès qu'elle a atteint son volume maximum et sa paroi superficielle déchirée permet alors la pénétration du pollen et sa progression vers

la sous-muqueuse. La bulle se forme dès que le grain de pollen entre en contact avec la surface épithéliale et elle apparaît exactement centrée par le grain de pollen qui constitue l'allergène. La taille de cette bulle paraît être grossièrement proportionnelle à la masse de l'allergène présent. Nous avons pu constater qu'un seul grain de pollen entraînait l'apparition d'une bulle de cent microns environ de diamètre, alors que quatre ou cinq grains agglutinés provoquaient l'apparition d'une bulle de trois à quatre cents microns. Il convient de noter, à propos de ces dimensions, qu'elles sont sensiblement égales ou à peine supérieures à celles qui limitent les zones d'arrêt du mouvement ciliaire précédemment décrites. En outre, la morphologie des aspects de rupture de ces bulles est telle que cette rupture ne peut être provoquée que par une hyperpression à l'intérieur de la cavité (photos 2 - 3 et 7).

Il est évidemment difficile de délimiter le temps de la formation, puis de l'éclatement de la bulle, il s'agit d'un phénomène très rapide dont la durée n'excède pas, croyons-nous, une dizaine de minutes.

Du point de vue histologique, un certain nombre de faits doivent être notés. Tout d'abord, le clivage tissulaire n'intéresse strictement que la couche cellulaire superficielle de la muqueuse ; la basale (lorsqu'elle existe) n'est jamais soulevée et demeure solidaire des structures sous-muqueuses. Ce fait rend peut-être compte de la *restitutio ad integrum* de l'aspect histologique que l'on peut constater en étudiant la muqueuse trois semaines après l'instillation d'antigène. En fait, comme la microscopie électronique l'a confirmé, les cellules qui sont situées au voisinage immédiat du point d'impact subiront une destruction totale, mais celle-ci nécessitera un peu plus de temps que n'en exige la formation de la bulle.

Une certaine cohérence cellulaire est donc maintenue, tout au moins durant un court laps de temps, et ceci d'autant plus, comme nous l'avons signalé, qu'il existe un gradient de destruction

cellulaire qui décroît très vite du point d'impact vers la périphérie. Ces faits expliquent que le couvercle de la formation bulleuse soit constitué de cellules profondément modifiées. Il ne s'agit plus, comme normalement, de hautes cellules prismatiques ciliées ; non seulement leur ciliature disparaît, mais encore elles s'aplatissent et s'allongent au point de ressembler à des cellules épithéliales indifférenciées.

Ce qu'il importe, ici encore, de souligner, c'est l'extraordinaire rapidité de toutes ces modifications histologiques qui s'effectuent à peu près simultanément. Dans quelques cas privilégiés, on assiste en quelque sorte à l'éclatement de la bulle. Il se produit évidemment pour deux raisons : tout d'abord, la pression provoquée par le liquide extra-cellulaire et, d'autre part, l'altération des structures cellulaires et intercellulaires offrant une résistance très amoindrie à cette pression intrabulleaire. Mais la formation de cette bulle ne résume pas toutes les formes de début. En d'autres cas, les destructions des cellules épithéliales sont d'emblée plus profondes. En présence d'une grande quantité d'antigène par unité de surface, les cellules apparaissent immédiatement en voie de lyse. D'emblée, les destructions cellulaires sont telles que les formations bulleuses (précédemment décrites et qui nécessitent pour se constituer un minimum de cohérence des cellules clivées) n'ont pas le temps de s'organiser. On observe, alors, des cellules épithéliales en voie de lyse, détachées et libres dans le mucus. En outre, la disparition de la ciliature est ici beaucoup plus extensive. Cette destruction massive de la couche cellulaire superficielle s'éloigne certainement de la réalité "pathologique" de l'allergie nasale où la concentration d'antigène aérien demeure beaucoup plus faible que lors d'instillations expérimentales massives.

Quelles que soient, cependant, l'intensité du processus initial et sa rapidité, celui-ci aboutit toujours à la destruction de la première ligne de défense constituée par l'épithélium cilié. Une telle destruction permet la pénétration du grain de pollen au

niveau des plans profonds, éventuellement même dans la sous-muqueuse. Ainsi s'achève la phase initiale du choc anaphylactique nasal et débute la deuxième phase, beaucoup plus longue, d'interaction entre le pollen et le tissu avec lequel il entre en contact.

Après la destruction de la couche superficielle de l'épithélium cilié, épithélium pseudo-stratifié comportant à sa partie profonde de nombreuses cellules de remplacement, le grain de pollen se trouve en contact avec des cellules de forme généralement cubique, et ainsi au voisinage immédiat de la membrane basale (lorsqu'elle existe). Cette membrane, constituée de tissu fibro-conjonctif, plus ou moins épais, plus ou moins lâche, suivant les zones, est très riche en cellules de la lignée blanche comme l'est aussi le chorion : lame de tissu conjonctif sous-jacent enserrant en ses mailles de très abondants éléments glandulaires séro-muqueux. Elle est parcourue par un réseau neuro-vasculaire très riche mais qui, chez le cobaye, n'atteint jamais à la constitution de zones de tissu érectile, caractéristique de l'architecture des cornets chez l'homme. La couche la plus profonde du chorion est dense et intimement adhérente au périchondre ou au périoste sous-jacent.

Si nous avons quelque peu insisté sur cette description très classique, c'est qu'en fait la pénétration du pollen est en majeure partie fonction de la résistance des plans sous-jacents à la destruction provoquée par la réaction antigène-anticorps, cette résistance étant conditionnée par l'importance de la sensibilisation des cellules, d'une part, et la cohésion plus ou moins affirmée des tissus du chorion, d'autre part.

Pénétration jusqu'au contact de la sous-muqueuse

Nous étudierons, tout d'abord, la durée de cette pénétration. En sacrifiant, de façon minutée, nos animaux d'expérience, nous avons pu montrer que cette pénétration jusqu'au contact de la sous-muqueuse peut être achevée trente minutes après l'instillation. Si l'on admet qu'il faut cinq minutes pour que le mouvement ciliaire s'arrête et cinq autres minutes pour que s'ouvre une brèche dans l'épithélium, c'est donc en quinze à vingt minutes que la pénétration est achevée et ce temps est probablement au-dessus de la réalité.

Il convient d'insister, toutefois, sur le caractère apparemment capricieux de cette pénétration. Si certains grains pénètrent rapidement dans la sous-muqueuse et ne s'arrêtent qu'en rencontrant un plan tissulaire plus résistant (le périchondre, en particulier), en revanche, certains restent dans l'épaisseur même de la muqueuse, laquelle chez le cobaye est de soixante à cent microns. Il arrive même, en de rares cas, que le grain de pollen se contente, après avoir détruit la bordure ciliée de s'accoler à la muqueuse en y creusant une logette dans la couche superficielle des cellules épithéliales qui sont alors aplaties, mais non détruites au niveau de ce point d'impact particulièrement net (photos 8 - 9 et 12).

De telles observations morphologiques posent le problème des facteurs qui régissent, à la fois, la lyse tissulaire et la pénétration des antigènes au sein de la muqueuse. Nous devons sous cet angle, pensons-nous, envisager ultérieurement le problème de désensibilisation par voie générale et analyser le rôle des anticorps bloquants qui résultent de cette désensibilisation.

Cette deuxième phase du choc anaphylactique nasal permet d'étudier en microscopie optique un certain nombre de problèmes, ou plus exactement de les poser de façon plus précise à l'étude électromicroscopique. Ce sont, essentiellement :

- les modifications tissulaires autour et sur le front de progression de l'antigène;
- les modifications cellulaires qui intéressent l'épithélium au niveau du point d'impact;
- les altérations subies par le grain de pollen au sein des tissus sensibilisés.

Le grain de pollen, au cours de sa progression, ne semble pas être en contact intime avec les cellules de la muqueuse, il est entouré d'une zone optiquement vide. Cette zone déborde de vingt à cinquante microns les limites du grain, elle témoigne des phénomènes de lyse qui se poursuivent et conditionnent sa progression vers la profondeur. Cette progression n'est pas rectiligne et il est rare de pouvoir mettre en évidence son trajet sur une notable distance. Les bords de la brèche sont constitués par des corps cellulaires qui sont, en quelque sorte, laminés, amincis et étirés dans un sens perpendiculaire à la surface libre de la muqueuse, orientés parallèlement au trajet qui vient d'être creusé.

Il existe, en avant du grain, une zone de profonde désorganisation tissulaire; les cellules apparaissent d'abord séparées entre elles par des espaces optiquement vides, secondairement seulement, apparaissent les altérations cytoplasmiques et, enfin la pycnose du noyau. Cette zone, qui constitue le front de progression de l'antigène, est d'ailleurs d'épaisseur très limitée (vingt à trente microns environ).

Lorsque le grain de pollen parvient au niveau du chorion, ou dans son voisinage immédiat, l'altération tissulaire la plus

évidente intéresse le système vasculaire, toujours très riche dans la sous-muqueuse. On constate, en effet, à ce niveau une très importante vaso-dilatation, en particulier lorsque l'animal est sacrifié sans perfusion préalable, on note dans la lumière dilatée des vaisseaux une masse d'hématies beaucoup plus importante que normalement.

Cette étude du système vasculaire de la muqueuse au cours du choc anaphylactique mérite attention. Nombreux, en effet, sont les auteurs (RUDOLPH J.A. et COHEN M.B. 1934; GAUTHIER VILLARS P. 1949; MELCHIOR R. 1950) qui, étudiant le mécanisme pathogénique des modifications tissulaires au niveau de la muqueuse, considèrent que le lieu d'élection de ces modifications est le réseau vasculaire sous-épithélial.

En fait, s'il est certain que le système vasculaire réagit au contact de l'allergène par une vaso-dilatation accompagnée de troubles de la perméabilité capillaire, l'ensemble aboutissant à un oedème par exsudation plasmatique et même à la sortie de cellules (en particulier, de polynucléaires éosinophiles), ces altérations, dans le cas des antigènes inhalés, sont secondaires à la pénétration. Elle ne jouent aucun rôle dans le déroulement de la période initiale de la crise anaphylactique, mais traduisent l'entrée en contact de l'antigène avec la paroi vasculaire et ses terminaisons nerveuses.

Quant à l'oedème qui distend tout le ströma, il s'agit là d'une manifestation classique qui accompagne toujours le choc anaphylactique. La laxité du tissu conjonctif, la richesse du lit vasculaire de la sous-muqueuse sont autant d'éléments anatomiques qui favorisent la formation de cet oedème. Dans les cas extrêmes, un tel oedème peut aboutir à une véritable désorganisation tissulaire et à la constitution de plans de clivage susceptibles de faciliter la progression en profondeur du pollen.

Modifications cellulaires

Parallèlement à ces modifications tissulaires, apparaît un phénomène d'ordre cellulaire : l'afflux des polynucléaires éosinophiles au voisinage de l'antigène, lorsque ce dernier a pénétré dans la muqueuse. L'afflux de ces cellules lors du déroulement des réactions anaphylactiques est d'ailleurs un élément d'accompagnement classique de ces dernières. KLINE B.S. et coll. (1932) mettent en évidence au niveau de la peau des sujets sensibilisés au pollen d'ambrosia (ragweed) une augmentation des éosinophiles dix minutes après injection intradermique d'extrait de l'antigène ; trente minutes plus tard, l'accroissement de ces cellules est tel que la plupart des polynucléaires apparaissent comme des éosinophiles. Ces résultats, au moins du point de vue temporel, sont très proches de ceux que nous avons pu observer au niveau des muqueuses nasales sensibilisées.

SPEIRS R.S. et ses collaborateurs, au cours d'une série d'études qui s'étendent de 1955 à 1957, ont montré que l'augmentation des cellules éosinophiles dans l'exsudat péritonéal accompagnait toute stimulation (pollen aussi bien qu'albumine) et se produisait également lorsque les animaux étaient surrénalectomisés. Par contre, l'administration de cortisone, qui inhibe la formation d'anticorps, inhibe également la réaction éosinophile. Dès 1952, nous avons constaté le même phénomène de diminution de la réaction éosinophile au niveau de la muqueuse nasale de cobayes sensibilisés et traités par instillations de cortisone (CHEVANCE L.G. 1952).

Afin de fixer la valeur "d'index" qui s'attache à l'afflux de ces cellules, il convient, tout d'abord, de déterminer aussi précisément que possible le nombre de ces dernières à l'état normal dans la muqueuse nasale des animaux d'expérience. Ceci, d'autant plus que l'épithélium, dans sa zone profonde et dans la sous-muqueuse, offre à l'examen un nombre non négligeable de polynucléaires. Cette étude fut réalisée de la façon suivante.

Sur des cobayes non sensibilisés furent pratiquées des coupes du massif nasal, d'une épaisseur de dix microns, la première de ces coupes passant dans un plan frontal situé à un centimètre et demi de l'orifice narinaire. Les coupes furent colorées par l'hémalun chromotrope 2 R (LENDRUM A.C. 1944) qui fait apparaître les granulations éosinophiles en rouge foncé. Pour chaque animal, furent examinés, sous un grossissement de quatre cents diamètres :

- dix champs microscopiques au niveau du septum ;
- dix champs au niveau des cornets inférieurs et moyens;

Nous avons trouvé, en moyenne, un polynucléaire éosinophile pour trois champs microscopiques. Ce résultat ne tient compte que des polynucléaires extra-vasculaires et situés au niveau de la muqueuse et de la partie superficielle du chorion.

Chez les animaux sensibilisés après instillation déclenchante, les numérations effectuées comme précédemment révèlent :

- entre dix et trente minutes après l'instillation d'allergène, un nombre d'éosinophiles égal ou à peine supérieur à la normale. Il existe, en effet, un temps de latence, d'ailleurs relativement court, entre le début de la réaction antigène-anticorps et le début de l'afflux des cellules éosinophiles ;
- à partir de la trentième minute, on note un accroissement très rapide du nombre des polynucléaires éosinophiles qui se traduit par des chiffres variant de quatre à sept cellules par champ . Ces cellules éosinophiles, qui ne sont pas disposées au hasard, se groupent autour des zones de pénétration du pollen et autour de la zone où le pollen se trouve enchâssé dans la muqueuse. Il n'est pas rare de trouver alors dix à quinze cellules disséminées à des distances variant de cinquante à cent microns de cette sorte de logette où se situe le

Nous n'avons jamais constaté, en microscopie optique, de contact intime entre cellules éosinophiles et grain de pollen. En fait, nous verrons plus loin que l'étude au microscope électronique nous a conduit à réviser cette notion. Il existe des contacts entre grain de pollen et polynucléaires éosinophiles, mais ces dernières cellules éclatent rapidement lorsque ce contact est réalisé, de sorte qu'au microscope optique leur mise en évidence devient impossible. En microscopie électronique, par contre, les granulations libres, qui persistent plus longtemps, sont aisément reconnues.

Il convient, enfin, de noter que si l'instillation déclenchante d'antigène est faite sous forme liquide (extrait aqueux de pollen, en l'occurrence), la concentration des polynucléaires est à peu près partout la même. Par contre, lorsque l'antigène est particulaire, la proportion d'éosinophiles diminue très notablement quand on s'éloigne de la zone de pénétration du grain et il existe des plages où leur densité n'est pas plus élevée que normalement. C'est là une preuve indirecte de la spécificité des relations complexes qui unissent, sur le plan biochimique au cours de la crise d'anaphylaxie, les polynucléaires éosinophiles et l'antigène.

Nous verrons plus loin que l'analyse des résultats obtenus grâce à la microscopie électronique apporte certaines précisions à ce sujet.

Les altérations ou destructions cellulaires que nous venons de décrire se développent au cours des deux premières heures de la réaction anticorps-antigène au sein de la muqueuse nasale. La microscopie optique, outre qu'elle rend compte de la pénétration de l'antigène (en l'occurrence le grain de pollen), permet aussi d'aborder les phénomènes de réparation tissulaire qui suivent cette pénétration. En effet, parallèlement à ces phénomènes de destruction, on constate une activité de réparation particulièrement évidente au niveau de la brèche ouverte par la pénétration du pollen dans l'épithélium cilié. Cette zone (surtout lorsqu'elle est de faibles dimensions) ne demeure pas béante, la

brèche créée est très rapidement colmatée ; elle peut l'être, d'après nos constatations, en deux heures environ. Nous avons précédemment, montré que les cellules épithéliales directement intéressées par l'impact du grain de pollen perdaient leur ciliature, étaient dissociées, puis finalement détruites, par un phénomène de lyse vacuolaire. Les cellules situées au voisinage immédiat de ces dernières (la zone de destruction totale n'est jamais très étendue) perdant également leur ciliature, s'aplatissent pour revêtir l'aspect de cellules épithéliales indifférenciées. Ces cellules apparaissent capables d'obturer la brèche ouverte dans la continuité du revêtement épithélial par une sorte de couvercle formé d'une seule épaisseur cellulaire. A ce niveau, les limites cellulaires demeurent peu nettes, alors qu'au contraire les noyaux apparaissent nettement colorés et d'aspect normal. Les modifications subies par le grain de pollen au sein de la muqueuse sont difficiles à mettre en évidence par la seule microscopie optique ; à cet égard, la microscopie électronique nous a fourni des résultats beaucoup plus probants. En raison de sa structure anatomique, les modifications que subit le pollen de bouleau n'intéressent pas immédiatement sa morphologie, et les méthodes histologiques classiques sont incapables d'en rendre compte. Bornons-nous à indiquer que la coloration à l'acide périodique Schiff, qui normalement colore intensément le contenu du grain, nous a paru, dans certains cas, mettre en évidence une certaine diffusion de ce contenu pollinique dans les tissus avoisinants, mais là encore, la microscopie électronique apportera, à la fois la preuve de ce phénomène et des précisions sur son mécanisme.

Enfin, en raison des destructions cellulaires qui accompagnent le choc anaphylactique, les recherches histochimiques ou histo-enzymologiques que nous avons entreprises se sont soldées par des échecs, en ce sens qu'aucune modification spécifique de la réaction antigène-anticorps n'a pu être mise en évidence. D'une part, en effet, les réactions enzymatiques concernées dans les échanges respiratoires (succinodéhydrogénase) sont surtout localisées au niveau des capillaires et des glandes de la sous-muqueuse et ne sont que secondairement intéressées par la réaction

antigène-anticorps. D'autre part, la destruction de la bordure ciliée entraîne la disparition des enzymes liées au mouvement ciliaire, en particulier, l'adénosine triphosphatase. Les seules réactions histochimiques qui offrent des modifications directement en rapport avec le choc anaphylactique sont celles concernant le glycogène. Nous verrons, en effet, qu'après une période initiale de disparition quasi-totale, ces réactions redeviennent intensément positives du troisième au dixième jour environ de l'entrée en contact de l'antigène avec les cellules migratrices dont l'afflux est déterminé par la présence de l'antigène.

Il ressort de l'analyse de nos résultats histologiques que si la microscopie optique est capable de mettre en évidence les phénomènes tissulaires conditionnant la pénétration de l'antigène (le pollen), elle se révèle parfaitement insuffisante pour analyser les phénomènes cellulaires qui accompagnent cette pénétration. Nous en voulons pour preuves, outre nos observations, les résultats publiés par STRÖMME O. (1955). Cet auteur avait, comme nous, observé la pénétration de certains pollens (seigle et bouleau) chez l'animal sensibilisé et la désorganisation cellulaire qui l'accompagne, mais (exemple frappant de l'insuffisance de la microscopie optique) cet auteur ne signale à aucun moment la destruction des cils de l'épithélium. La nécessité de recourir aux techniques de microscopie électronique s'est donc rapidement imposée à nous.

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE - ETUDE CHRONOLOGIQUE

Parmi les difficultés à résoudre, la plus importante est celle du repérage des grains de pollen (ou, plus généralement, de tout antigène particulaire déposé au contact de la muqueuse). Nous avons supposé qu'il devait être possible d'étudier, de façon minutée, le devenir de l'antigène depuis son entrée en contact avec la muqueuse sensibilisée jusqu'au moment du sacrifice de l'animal. Nous verrons que ce laps de temps s'est révélé très étendu.

Technique de repérage

Lors de nos études au microscope optique, nous n'avons jamais éprouvé de difficultés spéciales pour retrouver l'antigène, étant donné la quantité notable instillée par voie nasale et la possibilité de pratiquer des coupes sériées sur une distance notable de la filière nasale. Il n'en est, évidemment, plus de même lorsqu'on s'adresse, pour une telle recherche, à la microscopie électronique. La nécessité d'un repérage très précis est impérieuse ; en outre, ce repérage doit être tel qu'il ne modifie d'aucune manière l'activité physiologique normale de la muqueuse nasale (en particulier, battements ciliaires, degré hygrométrique et courants aériens respiratoires). Ce problème a été résolu de la façon suivante :

L'animal (cobaye, ou plus rarement lapin) est anesthésié par injection intra-péritonéale de penthotal sodique à 6 %, à raison de quarante milligrammes par kilo. Par voie médiane, les tissus recouvrant les os propres du nez sont incisés, puis réclinés vers le bas, et l'os est dépériosté. En un point situé à un centimètre et demi de l'extrémité nasale et à sept millimètres de la ligne médiane, l'os propre est perforé à l'aide d'un foret de deux millimètres et demi de diamètre. Cet instrument est manié

à la main pour éviter la perforation de la muqueuse qui double la face profonde des os propres du nez. La perforation osseuse étant exsangue, la muqueuse est percée en chauffant le foret pour éviter l'hémorragie, parfois importante, qui pourrait se produire et qui rendrait impossible l'instillation d'antigène. Il est dès lors possible, à l'aide d'une fine pipette Pasteur dont la pointe est introduite sous un angle repéré, de placer au contact de la muqueuse, sans aucun traumatisme notable, une petite quantité de l'antigène (poudre de pollen ou tous autres antigènes particuliers). Sur la perforation osseuse est ensuite appliqué un film plastique chirurgical, afin d'obturer immédiatement l'orifice, et les plans superficiels sont recousus. Dans ces conditions, nous n'avons jamais constaté le moindre incident ; en particulier, l'absence de toute rhinite post-opératoire mérite d'être soulignée.

Le temps de survie étant écoulé, l'animal est anesthésié, saigné par canulation de l'aorte abdominale et son sérum est recueilli pour effectuer les dosages d'anticorps circulants. Les os propres du nez étant exposés, l'orifice osseux opératoire est toujours aisément repéré, même si le temps de survie entraîne son comblement par du tissu fibreux. Une dissection simple permet alors, d'atteindre la zone du septum où fut déposé l'antigène et de prélever une surface de cinq à sept millimètres carrés de muqueuse en vue de la fixer immédiatement suivant la technique classique (glutaraldéhyde 3 % durant trente minutes, puis tétroxyde d'osmium 1 % durant vingt minutes).

Après déshydratation, l'inclusion est faite, soit dans l'araldite, soit en résine époxy. Dès que le degré de dureté est atteint, le bloc est taillé pour effectuer, sous loupe bino-culaire, une série de coupes à main levée suffisamment minces pour être disposées entre lame et lamelle et permettre leur examen au microscope en contraste de phase, sous un grossissement de cent à deux cent cinquante diamètres.

Tout le matériel inclus est ainsi examiné dans le but de retrouver les antigènes dans la muqueuse. Les prélèvements au

niveau desquels l'antigène est repéré sont alors collés à l'araldite sur des blocs d'époue dont une face est rigoureusement plane. Chacun de ces blocs, disposés sur un portoir spécial, est ensuite placé sous le microscope afin de pouvoir encercler, à l'aide d'une fine aiguille recourbée, le grain de pollen repéré à la surface du prélèvement. Il ne reste plus qu'à tailler le bloc sous loupe binoculaire, en respectant la zone précédemment délimitée sous microscope (photo 12).

Cette technique, qui peut paraître quelque peu fastidieuse à la lecture, est en fait aisée à mettre en oeuvre ; elle nous a permis de retrouver l'antigène et de l'étudier dans trente-quatre cas sur trente-six ainsi traités.

Etude chronologique des modifications cellulaires

La première partie de cette étude fut consacrée aux interactions qui s'établissent entre grain de pollen et cellule de la muqueuse sensibilisée.

Les fixations furent effectuées une heure, vingt heures, trois jours, cinq jours, sept jours, huit jours, dix jours, onze jours, quinze jours et vingt-sept jours après l'instillation déclenchante de pollen. Cette chronologie coïncide avec celle qui fut respectée lors de l'étude en microscopie optique (où, toutefois, le délai le plus long ne fut que de onze jours). On peut donc ainsi comparer utilement sur certains points les données fournies par chacune des méthodes, optique et électronique.

Une heure après instillation, le grain de pollen est parvenu au sein de la muqueuse et les altérations cellulaires sont très apparentes. Le grain s'est creusé une sorte de canal nettement visible lors de l'examen en microscopie optique du bloc

destiné à être taillé selon la technique précédemment décrite. Cet aspect est retrouvé au niveau des coupes de microscopie électronique et, d'emblée, le fait le plus évident est celui de la disparition totale de toute structure ciliée (photo 13).

Les cils sont coupés au ras de leur implantation sur la surface cellulaire libre, comme tranchés à la faux. Il n'est pas rare d'en voir libérés de leurs attaches, "flottants" au niveau de l'exsudat qui accompagne le grain de pollen, ou même accolés à ce dernier.

Morphologiquement, leur destruction s'effectue par fragmentation successive et leur disparition est probablement très rapide. A ce stade, également, on note divers types de processus destructifs au niveau des cellules épithéliales. Tout d'abord, la libération totale du corps cellulaire qui, privé de toute connexion avec d'autres cellules, apparaît comme isolé au sein de l'oedème interstitiel. Ces cellules sont toujours très altérées, leur cytoplasme est en voie de lyse vésiculaire, mais il est à noter que les structures nucléaires sont plus résistantes ainsi que les corpuscules basaux des cils, qui existent encore, bien que ces derniers aient disparu. On constate ensuite la dégénérescence *in situ* qui intéresse essentiellement les cellules bordant le canal creusé par le pollen et qui se caractérise par une vésiculation du protoplasme et même l'apparition de figures myéliniques de dégénérescence, aspects qu'on aurait pu supposer de naissance plus tardive. Les noyaux paraissent beaucoup plus résistants et il est difficile de déterminer si les cellules situées à quelque distance du grain de pollen subiront ou non une lyse complète.

Le canal néoformé par la pénétration de l'antigène offre un contenu variable :

- des globules rouges, toujours présents et qui paraissent parfaitement normaux, insensibles en apparence à la réaction antigène-anticorps ;

- des débris cellulaires, souvent accolés à la paroi externe du pollen, et au sein desquels toutes les organelles

... ont disparu :

- divers types de polynucléaires et tout particulièrement de polynucléaires éosinophiles situés, soit dans la muqueuse à quelque distance du grain, soit libres dans le voisinage immédiat du grain. En fait, ces polynucléaires éosinophiles viennent s'accoler au grain de pollen et subissent une dégénérescence qui semble être différente de celle des cellules épithéliales. Il s'agit d'un véritable éclatement, avec libération des granulations éosinophiles, facilement reconnaissables à leur structure pseudocristalline.

Alors que l'ensemble de la cellule semble ainsi se lyser très rapidement, la membrane unique qui entoure ces granulations résiste un peu plus longtemps ; mais il est certain qu'elles doivent, elles aussi, éclater en libérant leur contenu enzymatique (puisque ces granulations sont en fait des lysosomes) (photo 14).

La microscopie électronique permet donc de préciser un certain nombre de données et même de corriger certaines erreurs que nous avons commises lors de l'étude en microscopie optique. Elle apporte des précisions sur la destruction des cils, sur les dimensions du canal néoformé, qui ne paraît pas dépasser cinquante microns dans sa plus grande largeur. Elle précise les contacts du pollen avec les cellules bordantes de ce canal, contacts établis sur une zone de faibles dimensions, la plus grande partie de l'exine demeurant libre de tout contact cellulaire, ce qui rend compte de l'aspect en logette constaté en microscopie optique. Mais surtout, elle précise les modes de réaction spécifiques des différents types cellulaires, modes qui répondent, certainement, à des aptitudes immunologiques différentes de leurs constituants protoplasmiques. Elle précise, enfin, les modalités des contacts entre grain de pollen et polynucléaires éosinophiles.

Le rôle exact joué par ces dernières vis-à-vis de l'antigène n'est pas encore élucidé, en dépit du nombre considérable de travaux publiés sur ce sujet. Parmi les plus importants,

il convient de noter ceux de COONS A.H. (1955). En utilisant la méthode de marquage à la fluorescéine, qu'il a mise au point et qui est largement utilisée en immunologie, cet auteur a montré qu'au cours du choc anaphylactique les cytoplasmes des cellules éosinophiles contiennent des inclusions fluorescentes, témoins de la localisation d'antigènes. SPEIRS R.S. (1958) propose une théorie immunologique selon laquelle les éosinophiles réagissent avec les antigènes pour fournir aux cellules phagocytaires des molécules susceptibles d'être utilisées ultérieurement par les cellules formatrices d'anticorps. SABESIN S.M. (1963), en utilisant la ferritine comme marqueur antigénique, a montré que les éosinophiles au niveau de l'exsudat péritonéal provoqué par l'injection déclenchante, capturaient le complexe ferritine-antigène. Nous verrons ultérieurement, lors de l'étude des résultats de nos marquages antigéniques par la ferritine, que nous avons également retrouvé des molécules de ferritine au niveau de vésicules cytoplasmiques chez les polynucléaires éosinophiles. Ces cellules apparaîtraient donc, en ces conditions expérimentales, comme des macrophages d'un type très particulier. Il est certain qu'elles sont incapables de synthétiser les anticorps, leur structure interne l'indique clairement.

Toute théorie concernant le rôle de ces cellules au cours de la réaction antigène-anticorps doit tenir compte :

- 1) de la précocité et de la constance de leur action, leur localisation étant toujours constatée au voisinage de l'antigène vingt à trente minutes seulement après instillation de ce dernier. Ces cellules constituent donc la première "vague d'assaut" contre les protéines étrangères introduites dans l'économie ;

- 2) de leur richesse en granulations de valeur lysosomale. Bien que l'on ignore encore si la formation, d'apparence cristalline, qu'elles contiennent et qui caractérise la cellule est constituée d'un complexe enzymatique ou d'une seule enzyme, il est certain qu'il s'agit essentiellement d'hydrolases.

3) du comportement de la membrane de ces lysosomes, qui apparaît très particulier lors du contact de la cellule avec l'antigène. En effet, nous l'avons vu, la cellule est atteinte par un processus de nécrose brutale qui provoque la disparition de toutes les organelles cellulaires, à l'exception des granulations éosinophiles. Ces dernières sont expulsées de la cellule et persistent, au moins quelques temps, intactes en apparence, dans le liquide d'oedème interstitiel. Or, ce n'est pas là un comportement habituel des lysosomes. DE DUVE C. (1970) précise que le mécanisme qui gouverne l'activité lysosomale peut se résumer en un processus de fusion de membranes cytoplasmiques. Ceci est vrai, soit que le lysosome fusionne sa propre membrane avec la membrane limitante de la cellule, les enzymes seraient alors expulsées vers le milieu extérieur (mécanisme qui rendrait compte de l'activité des ostéoclastes), soit, et plus souvent, que la fusion ait lieu entre une vésicule de pinocytose et un lysosome au sein du cytoplasme. Le lysosome se comporterait alors comme une sorte de vésicule digestive. En tout cas, l'expulsion des granulations est un phénomène qui n'entre pas dans le cadre de la physiologie normale des lysosomes ; il prouve qu'en cas de choc anaphylactique, tout au moins lorsque l'antigène est de dimensions telles qu'il ne peut être phagocyté, il existe une déviation du mécanisme normal d'action des polynucléaires éosinophiles qui déversent dans le milieu extérieur une quantité considérable d'enzymes hydrolytiques. Ces dernières peuvent, sans doute, agir sur l'antigène, mais certainement aussi sur les cellules voisines, contribuant ainsi à accroître et à prolonger l'importance des activités cytotoxiques qui résultent du contact initial entre antigène et cellules sensibilisées.

Ces enzymes hydrolytiques semblent n'avoir aucune action sur le grain de pollen qui, morphologiquement, demeure intact. A ce propos, une question ne peut manquer d'être posée à ce premier stade chronologique de notre étude, c'est celle de l'ouverture

des pores polliniques qui permet, nous le verrons, l'expulsion du contenu du grain de pollen. En particulier, les hydrolases libérées par les lysosomes au contact ou au voisinage immédiat du grain sont-elles responsables de l'ouverture des pores ?

Anatomiquement, le pore du pollen de bouleau est constitué par une déhiscence circulaire de la partie périphérique de la coque, ou exine. Cette ouverture qui mesure environ sept à huit microns de diamètre est limitée par une berge légèrement saillante, l'ensemble rappelle l'aspect de ce que les anatomistes appellent "un museau de tanche". Normalement, l'occlusion du pore est assurée par une série de six ou sept lamelles superposées qui émanent de la limitante interne de l'enveloppe, ou entine. En dehors de ses trois pores, destinés normalement au passage des stolons, le pollen de bouleau possède une capsule extrêmement résistante et qui l'isole parfaitement du milieu extérieur. A tel titre qu'il s'agit là d'un des pollens qui est utilisé en paléo - palynologie pour la datation des sédiments fossiles. Or, si l'on met du pollen sec en contact avec de l'eau, on constate en dosant les protéines qu'une proportion notable du contenu pollinique est, en cinq minutes, passé en solution. Il résulte de cette donnée expérimentale, complétée par les données morphologiques que nous verrons ultérieurement, qu'il suffit de mettre le pollen desséché en milieu aqueux pour obtenir l'ouverture extrêmement rapide de ces pores. Cette ouverture n'apparaît donc pas fonction, comme on pourrait le supposer à priori, de la teneur en anticorps du milieu ambiant (photo 15).

Le deuxième stade chronologique que nous avons étudié est celui résultant d'un contact de vingt heures entre pollen et muqueuse sensibilisée. A ce stade, le pollen demeure encore séparé des structures tissulaires (qu'il s'agisse de la muqueuse ou de la sous-muqueuse) par une zone de lyse qui traduit la poursuite des phénomènes cytotoxiques. Cette zone focale péri-pollinique est partiellement occupée par des débris cytoplasmiques,

témoins de l'intense destruction cellulaire. Dans le voisinage immédiat, les cellules épithéliales offrent à étudier des phénomènes de lyse vésiculaire, mais le phénomène paraît de moindre extension que lors du stade précédent. Si les cellules les plus proches de l'antigène sont altérées au point de devenir méconnaissables, en revanche celles situées à quelque distance, bien que profondément modifiées (perte de la ciliature, aplatissement, lyse vacuolaire partielle), semblent bien devoir survivre au choc anaphylactique. En particulier, ni le noyau, ni les mitochondries ne disparaissent. Ce fait concorde avec les observations faites en microscopie optique concernant les phénomènes d'occlusion par des cellules de type épithélial indifférencié de l'orifice de pénétration. Les polynucléaires éosinophiles sont encore présents, mais en moins grand nombre que lors des premières heures qui suivent la pénétration de l'antigène. Par contre, un nombre plus grand de polynucléaires (neutrophiles) apparaissent ; ils sont d'ailleurs, au même titre que les éosinophiles et que les cellules épithéliales, atteints par les processus cytotoxiques qui caractérisent cette période.

Le troisième stade chronologique de notre étude concerne les contacts établis depuis trois jours au sein de la muqueuse nasale sensibilisée. A ce stade, l'aspect cytologique s'est profondément modifié par rapport aux deux précédents qui, nous avons pu le constater, n'apparaissent pas fondamentalement différents l'un de l'autre. (photo 16)

Les modifications tiennent essentiellement à deux faits nouveaux :

- le grain de pollen apparaît étroitement enchâssé par une réaction cellulaire monomorphe ;
- le grain de pollen offre à étudier, et ceci pour la première fois, certaines modifications de sa structure interne.

Durant les premières vingt-quatre heures, le grain de pollen n'est jamais en contact intime sur toute sa périphérie avec des cellules quel qu'en soit le type. L'exemple le plus évident de ce fait est offert par les polynucléaires éosinophiles dont le contact aboutit en effet, très rapidement à la destruction cellulaire. Par contre, après soixante douze heures de séjour dans la muqueuse (ou la sous-muqueuse), l'aspect est très différent, les grains de pollen sont presque toujours entourés par des cellules dont la morphologie indique qu'il s'agit de cellules migratrices et qui sont étroitement moulées sur l'exine du pollen. Si leur rôle est évident, il est néanmoins difficile d'attribuer sans hésitation un nom précis à ces cellules. Ceci, pour deux raisons. Tout d'abord, de façon absolument constante, une proportion importante d'entre elles est en voie de lyse vacuolaire. Cette lyse est en tous points semblable à celle que nous avons observée au niveau des cellules épithéliales. D'autre part, ces cellules sont étroitement moulées sur l'exine et apparaissent, en quelque sorte, laminées à son contact. Cependant, en raison de leurs nombreux prolongements protoplasmiques périphériques (qui sont imbriqués entre eux et accolés à la coque de pollen), en raison également de la richesse de leurs structures lysosomales, ces cellules peuvent être considérées comme des macrophages. Outre ces cellules de valeur macrophagique, des polynucléaires, dont une des caractéristiques est leur richesse en granulations polymorphes, prennent également part, mais dans une moindre mesure, à cet encerclement du pollen. Leur présence fait ressortir la disparition totale à ce stade des polynucléaires éosinophiles. Il est remarquable que ces cellules apparaissent toutes comme étant dotées de motilité. En effet, les cellules fixes épithéliales demeurent à distance et ne jouent aucun rôle dans le processus de séquestration de l'antigène. Ces faits posent le problème du renouvellement des cellules mobiles qui enserrent le grain de pollen ; étant donné qu'un tiers environ de ces cellules est en voie de lyse vésiculaire, processus qui est certainement de très courte durée, il apparaît certain que ce renouvellement est constant et qu'il s'effectue de façon rapide.

La structure du grain de pollen est également modifiée non seulement par l'ouverture de ses pores (qui s'est effectuée probablement beaucoup plus précocement) mais également par le contenu du grain, qui commence à quitter, par ces pores, l'intérieur de la coque. Pour la première fois, une différence de densité électronique se révèle dans des zones ovalaires situées en regard de ces bouches, de part et d'autre de la coque. Cette extrusion du matériel antigénique s'effectuant, nous le verrons, lentement et de façon continue rend compte de l'aspect morphologique des cellules macrophages dont les capacités d'assimilation du matériel antigénique sont débordées par l'importance de l'apport de ce dernier. (Rappelons qu'une sphère de vingt-huit microns de diamètre représente un volume de douze mille cinq cents microns cubes). Il en résulte une destruction d'une masse cellulaire très importante prouvant qu'à ce stade les cellules des zones profondes de l'épithélium sont incapables de combler la logette où se trouve l'antigène entouré de macrophages en voie de lyse et qui se renouvellent constamment.

La microscopie optique nous avait montré des aspects en "grelot" de telles logettes, enfermant de très nombreuses cellules groupées autour de masses dont il était difficile d'affirmer s'il s'agissait bien de grains de pollen, tant leurs contours étaient masqués par ces cellules. Il convient de noter que ces logettes, même lorsqu'elles sont situées à peu de distance du plan superficiel de la muqueuse, sont recouvertes par un néo-épithélium fermé par les cellules aplaties qui proviennent de la transformation des hautes cellules ciliées et assurent la continuité de l'épithélium respiratoire.

Le quatrième stade chronologique nous a permis d'étudier les interactions qui s'effectuent entre antigène et muqueuse sensibilisée après cinq jours de contact. Comme dans le cas précédent, le grain est toujours très étroitement entouré, sur toute sa circonférence, par des cellules de valeur macrophage. Les réactions morphologiques traduisent la cytotoxicité provoquée par la

réaction antigène-anticorps se poursuivent et de nombreuses cellules apparaissent encore en voie de lyse au pourtour du grain, mais la proportion de ces dernières est cependant moins importante qu'au niveau des coupes examinées après trois jours de contact. En outre, et cette constatation va dans le même sens que la précédente, on note une diminution des leucocytes polynucléaires dans le voisinage immédiat du grain (photo 17).

Une modification d'importance majeure s'impose à ce stade, il s'agit de la très grande richesse en glycogène des cellules macrophages. C'est là un fait nouveau que nous n'avons pas constaté sur les coupes provenant d'un contact de trois jours. Cette charge cytoplasmique en glycogène apparaît donc et se développe entre le troisième et le cinquième jour ; ce phénomène est nettement en rapport avec le contact antigénique, car les cellules les plus éloignées du grain ne se chargent pas en glycogène, ou du moins n'offrent pas une teneur très supérieure à la normale. Ce polysaccharide est inégalement réparti, tantôt en gros amas situés plus souvent à la périphérie de la cellule, tantôt en particules dispersées, généralement juxta-nucléaires. La démonstration en microscopie électronique de ce corps est basée sur la réaction au thiocarbohydrazide couplé au protéinate d'argent, après oxydation préalable par l'acide périodique (HANKER J.S. 1964; SELIGMAN A.M. 1963). Les résultats que nous avons obtenus par l'emploi de cette coloration dont la spécificité a été confirmée par THIERY J.P. (1967), indiquent bien, comme l'étude morphologique le laissait prévoir, qu'il s'agit de glycogène (photos 17 et 18).

Les modifications subies par le grain de pollen, jusqu'ici très limitées, se font plus importantes et traduisent la lente évacuation de son contenu dans l'atmosphère cellulaire qui l'entoure. Ce n'est que très tardivement, nous le verrons, (27ème jour) que la coque du pollen est altérée dans son ultra-structure et sa morphologie (photos 19 et 20).

En revanche, le contenu du grain se fragmente en masses arrondies, sans structure interne et, à mesure que l'on approche des pores, ces masses elles-mêmes disparaissent, comme dissoutes par le liquide interstitiel. Si l'on ne peut donc mettre en évidence de façon directe le passage du contenu pollinique dans le milieu extérieur, on peut cependant noter, avec une grande fréquence, l'existence en regard du pore d'une zone ovalaire et optiquement vide dont les dimensions peuvent varier de dix à cinquante microns. Ce fait morphologique prouve indirectement que le processus d'extrusion de l'antigène n'est pas terminé et que la destruction cellulaire se poursuit. Sous cet angle, l'activité du pollen peut être considérée comme la plus parfaite des injections "à effet retard" qu'il soit possible de réaliser. En effet, bien qu'il existe de larges variations individuelles dans le comportement des différents grains, on peut admettre qu'à ce stade environ, la moitié seulement du contenu pollinique a disparu.

Les aspects observés en microscopie optique sont quelque peu différents en ce sens que, si certains grains apparaissent étroitement entourés par une réaction cellulaire (dont il est, d'ailleurs, difficile d'affirmer la nature en raison des phénomènes de lyse précédemment signalés), en de nombreux cas, les grains de pollen semblent isolés dans une logette constituée à distance par des cellules profondes de la muqueuse. Il est évident qu'on ne peut comparer les résultats, du fait que la microscopie optique nous a permis d'étudier une centaine d'inclusions polliniques alors que l'étude en microscopie électronique repose sur un premier choix de coupes épaisses offrant évidemment une moins grande variété. Toutefois, la teneur en glycogène s'avère également très élevée dans les cellules accolées au pollen.

Le cinquième stade que nous avons étudié concerne un contact de sept et de huit jours (nous avons, en effet, réuni ces deux stades qui ne présentent pas de différences notables ; photos 21 et 22).

Après sept ou huit jours de contact avec la muqueuse sensibilisée, le grain de pollen apparaît toujours étroitement enchâssé par des cellules de type macrophage. Les aspects de lyse vacuolaire des cellules et leur fréquence sont comparables à ceux observés lors du stade précédent. La preuve, d'ailleurs, que les antigènes continuent d'être déversés à l'extérieur est fournie par l'examen de la région des pores du pollen. Plus nettement encore que lors du stade précédent, on trouve des logettes optiquement vides, de grandes dimensions en regard de ces bouchons.

Un fait nouveau apparaît ici : les cellules macrophages qui enserrent étroitement le grain de pollen offrent moins d'aspects dégénératifs que lors des stades précédents et, surtout, ces aspects paraissent moins destructeurs. Certes, il existe encore des zones arrondies de lyse dans le cytoplasme, mais elles sont très limitées et, apparemment, la cellule n'est plus en voie de dégénérescence rapide. Ce fait revêt d'autant plus de valeur que le cytoplasme de ces cellules renferme toujours une importante quantité de glycogène. Dans ce cas particulier, tout se passe morphologiquement comme si, n'étant plus immédiatement (ou tout au moins rapidement) détruites par la masse de l'antigène qu'elles tentent de métaboliser, elles se chargeaient en glycogène. L'apparition de ce polysaccharide marquerait donc la fin de la période véritablement cytotoxique du choc anaphylactique et le début du stade d'assimilation de l'antigène.

Quant au grain de pollen, si sa coque demeure absolument intacte, par contre sa structure interne est de plus en plus fragmentée, en particulier la dégénérescence des mitochondries (qui sont normalement abondantes au niveau du noyau germinatif) est telle qu'elles ont pratiquement disparu. Après sept ou huit jours de contact avec le tissu sensibilisé, on peut estimer que les deux tiers ou, suivant le cas, les trois quarts du contenu pollinique ont disparu.

Les données de la microscopie optique, à ce stade, ne divergent pas de celles observées précédemment. Seules des nuances touchant l'importance de la destruction cellulaire peuvent être relevées.

Dans le sixième stade étudié, nous grouperons les constatations que nous avons pu faire au niveau des préparations renfermant des grains de pollen ayant pénétré depuis, respectivement dix et onze jours dans la muqueuse nasale des animaux d'expérience.

Comme précédemment, le grain de pollen est étroitement entouré par des cellules de valeur macrophage, mais un certain nombre de modifications morphologiques importantes méritent d'être soulignées . (photos 23 et 24) :

- il n'existe plus d'aspects de lyse vacuolaire, telle qu'elle a été notée tout au long de l'évolution jusqu'au stade des sept jours. La richesse en reticulum endoplasmique et en ribosomes n'en est que plus apparente ;

- les inclusions de glycogène, si abondantes lors des stades précédents, ont à peu près entièrement disparu ;

- enfin, on relève la présence dans le cytoplasme de ces mêmes cellules macrophages, de granulations denses aux électrons et limitées par une seule membrane. Il s'agit de lysosomes ; ce n'est pas là un fait absolument nouveau, puisque le cytoplasme des macrophages renferme normalement une proportion notable de telles vésicules, mais ce qui mérite d'être noté est la nette multiplication de ces vésicules, qui coïncide à peu près avec la disparition de très importantes inclusions de glycogène.

Que les lysosomes jouent un rôle dans l'élaboration des substances antigéniques est prouvé par le fait que les lymphocytes en culture immunologique en renferment beaucoup plus que les lymphocytes normaux, qui en sont très faiblement pourvus en l'absence de toute stimulation antigénique. Tout se passe ici comme si ces cellules, vers le huitième ou dixième jour de contact antigène-macrophage (c'est-à-dire lorsque la période la plus aiguë de la réaction antigène-anticorps est terminée), étaient capables, sans subir de dégénérescence, d'assimiler et de transformer les protéines étrangères grâce à l'abondance des enzymes hydrolytiques qu'elles contiennent.

Que la période aiguë soit terminée est, par ailleurs, prouvé par l'aspect du grain de pollen ; ce dernier, en effet, offre une coque parfaitement normale, mais vidée aux trois quarts de sa substance et l'accolement des cellules macrophages à cette coque est intime. En conséquence, il n'existe plus, en regard des bouches du pollen, les zones de lyse que nous avons précédemment signalées.

L'étude en microscopie optique permet, à ce stade, de noter la relative rareté des grains de pollen inclus près de la surface de la muqueuse dont les cellules sont aplaties et ont perdu leur ciliature. Le grain est situé dans une logette vide, l'ensemble revêtant un aspect en "grelot". Ici, encore, la morphologie n'est pas absolument comparable à celle observée en microscopie électronique et il faut souligner la richesse des renseignements que cette dernière fournit à cet égard.

Le septième stade de cette séquence concerne l'interaction entre cellules et pollen après un séjour de quinze jours au sein de la muqueuse nasale sensibilisée (photo 25).

Un certain nombre de faits nouveaux caractérisent ce stade tardif du choc anaphylactique :

- l'apparition, autour de l'antigène, de cellules dont la morphologie interne dénote une capacité d'élaboration ;
- la mise en évidence de coques vides, mais intactes morphologiquement ;
- la régénérescence des structures ciliées.

L'aspect des cellules situées au contact du grain de pollen subit, à ce stade, de profondes modifications. Il apparaît, en effet, un petit nombre de cellules caractérisées par un ergastoplasme plus important que celui des macrophages, formé de sacs étroitement accolés, et par l'existence de corps de Golgi dont les

citernes se fondent dans des vésicules dilatées. Ces cellules sont, par ailleurs, pourvues de très nombreuses vésicules possédant à leur périphérie une zone dense aux électrons. Ces vésicules peuvent être considérées comme des corps de Russel. Ces cellules apparaissent donc dotées d'un pouvoir d'élaboration protéique important les distinguant des macrophages et permettant de les considérer comme étant de valeur plasmocytaire. Il est généralement admis, actuellement que de telles cellules élaborent les globulines qui constituent les anticorps (photos 26 et 27).

Nous devons à la vérité de signaler que, si des grains de pollen ont été retrouvés après un laps de temps aussi prolongé, ce fut en petit nombre par rapport, d'une part, à la quantité instillée suivant la technique opératoire déjà décrite, et d'autre part, à la quantité que nous avons retrouvée (et beaucoup plus aisément) au niveau de tous nos prélèvements précédents. Ces grains sont généralement situés plus près de la surface libre de l'épithélium que ne l'était la majorité de ceux observés dans les précédents stades. Cette surface libre de l'épithélium présente un aspect différent de celui caractérisant la phase aiguë du choc anaphylactique (c'est-à-dire, on l'a vu, destruction des cils vibratiles, lyse vacuolaire du cytoplasme, disparition des cellules épithéliales situées dans la zone de la réaction antigène-anticorps et dédifférenciation de ces mêmes cellules situées immédiatement en dehors de la zone de destruction) (photo 28).

Après quinze jours d'évolution, les cellules bordantes de l'épithélium, si elles n'ont pas retrouvé un aspect entièrement normal, apparaissent cependant plus hautes et d'aspect plus "épithélial". La bordure ciliée est très anormale en ce sens que la structure interne du cil est incomplète. En effet, les coupes transversales révèlent l'existence de deux, trois ou quatre tubules assez irrégulièrement répartis, au lieu des neuf structures tubulaires symétriquement espacées à la périphérie qui caractérisent la morphologie électronique du cil (photo 28). La régénérescence de la muqueuse ciliée, qui répétons-le, est toujours entièrement

détruite au cours du choc anaphylactique (il ne peut donc s'agir ici de structures ciliées résistantes à cette lyse), n'a pas encore fait l'objet d'études précises qui permettent d'interpréter ces données morphologiques. Les auteurs se sont attachés à étudier cette régénérescence après lésions chirurgicales de la muqueuse. BOLING (1935), après excision d'un fragment de muqueuse nasale chez le mouton, a montré que l'épithélium se régénère à partir des bords de la plaie opératoire, par migration des cellules des zones voisines normales. HILDING D.H. (1966), qui s'est particulièrement attaché à ce problème, a montré qu'après excision de larges fragments de muqueuse au niveau du nez et des sinus chez le chien et le lapin, les aires excisées étaient comblées par un tissu conjonctif dont l'importance empêchait la régénérescence épithéliale. Après destruction mécanique des structures ciliées de la trachée, cet auteur a montré par une étude au microscope électronique la persistance et même la multiplication des centrosomes. En accord avec les études antérieures de STOCKINGER L. et BURIAN K. (1957), cet auteur constate que les cils néoformés sont à peu près homogènes et que leur fibrilles se développent inégalement. Si la technique utilisée par ces auteurs est très éloignée de la nôtre et ne permet pas de conclure à une identité des mécanismes de régénération, il semble néanmoins que nous saisissons ici le début de la régénérescence des cellules ciliées après destruction immunologique.

Le grain de pollen est caractérisé à ce stade (quinzième jour) par sa vacuité. Tous les grains étudiés sont vidés de leur substance, ou, lorsqu'il persiste quelques traces de cette dernière, c'est sous forme d'une substance anhiste. Par contre, la coque du grain de pollen demeure intacte. Il nous a été impossible de mettre en évidence la moindre fissure ou déformation de ses deux limitantes (externe et interne), pas plus qu'une diminution nette de la densité aux électrons de ces mêmes structures.

A propos de ces dernières constatations, qui démontrent la possibilité d'obtenir des coques de pollen vidées de leur substance par une réaction immunologique, signalons que pour obtenir

des coques de pollen vides, afin d'en étudier la structure au microscope électronique, les palynologistes (AFZELIUS B.M., 1956) les soumettent à une hydrolyse acide prolongée à chaud. Cette méthode est singulièrement drastique et il serait, sans doute, intéressant de comparer les coques vidées par l'hydrolyse, d'une part, et par les réactions immunologiques, d'autre part.

Le stade ultime des contacts que nous avons étudiés concerne la présence durant vingt-sept jours du pollen au sein de la muqueuse sensibilisée. Après un contact aussi prolongé, le repérage de l'antigène en microscopie optique par coupes épaisses devient plus difficile. Il est indispensable de disposer d'un microscope à contraste de phase et d'un éclairage très puissant. Les coques vides sont en effet, nous le verrons, envahies par des prolongements cellulaires qui diminuent leur contraste optique (photo 29 - montage).

Le grain de pollen, à ce stade, offre des aspects entièrement nouveaux par rapport à ceux observés lors des différentes phases précédentes. Le fait le plus important est l'existence de nombreuses ruptures de la coque, il ne s'agit certainement pas ici d'artefacts pour les raisons suivantes :

- 1) cette rupture ne se produit jamais sur une coque intacte ;
- 2) elle est précédée de très importantes déformations qui traduisent une diminution considérable de la résistance mécanique de la coque. (photo 30).

En effet, toutes les coques précédemment trouvées au niveau des coupes dessinaient un ovale régulier dont les limites externes n'étaient interrompues que par les pores, lorsque le trait de section passait à ce niveau.

A ce stade de vingt-sept jours, il n'en est plus de même. En de très nombreux cas, la coque offre des plissements qui tous

traduisent une pression s'exerçant de l'extérieur vers l'intérieur de la capsule, les dépressions ainsi formées étant occupées par des prolongements cellulaires.

De telles déformations traduisent une diminution considérable de la résistance de la coque, laquelle se manifeste également par un amincissement très notable de l'exine et par une diminution de la densité électronique, normalement très grande, de cette limitante externe. L'intine semble moins profondément modifiée, elle doit, sans doute, cette relative protection au fait qu'elle est moins directement en contact avec les cellules qui enserrrent ce qui reste du grain. Il convient, cependant de noter qu'à ce stade la présence de prolongements protoplasmiques à l'intérieur de la coque est un fait constant.

Ces déformations sont accompagnées de ruptures de la continuité de la coque et d'un début de fragmentation de cette dernière. De profondes transformations sont également notées au niveau de l'atmosphère cellulaire qui entoure le foyer. Comme précédemment, immédiatement au contact de la coque, persistent les cellules macrophages, mais à la différence de celles décrites lors des stades précédents, leur structure interne est marquée par deux aspects qui ne sont pas classiques chez les macrophages :

- a) un aspect périnucléaire dilaté ;
- b) un ergastoplasme plus abondant, bien qu'il demeure pauvre en ribosomes.

Outre ce type cellulaire, qui est le plus abondant, on retrouve également au voisinage immédiat de l'antigène des polynucléaires neutrophiles dont la richesse en lysosomes mérite d'être signalée.

Mais le fait le plus caractéristique à ce stade est représenté par la réaction plasmocytaire dont les premières manifestations avaient été notées au stade des quinze jours de contact. Elle s'affirme ici, à la fois, par l'abondance et la multiplicité des aspects qu'elle revêt (photos 31 - 32 et 33) :

- a) les cellules plasmocytaires ne sont jamais en contact direct avec l'antigène ; elles en demeurent séparées

par une ou plusieurs épaisseurs de cellules qui sont, on l'a vu, soit des macrophages, soit des polynucléaires.

- b) Les aspects plasmocytaires sont constitués par différents types cellulaires et il convient de noter, à ce propos, qu'il est rare de pouvoir les observer ensemble à ces différents stades. C'est là un des avantages du modèle expérimental à antigène fixe. Il s'agit de plasmocytes classiques, mais aussi de formes jeunes, plasmoblastes, ou même des formes de transition, encore actuellement discutées, de type lympho-plasmocyte. Tous ces types cellulaires, et c'est là un fait plus important que la terminologie cytologique, sont caractérisés par leur richesse en ribosomes, l'existence d'un espace périnucléaire très dilaté, de même que par la présence de sacs ergastoplasmiques également dilatés qui comblent (au moins pour les formes mûres) le cytoplasme presque totalement.
- c) Enfin, les contacts entre les membranes limitantes des plasmocytes et des cellules macrophages péri-focales sont extrêmement nombreux et intimes. Il peut s'agir d'accolement, sur quelque distance, de leurs membranes respectives. Il semble même qu'en certaines zones, le cytoplasme du plasmocyte fusionne sans interposition membranaire avec celui du macrophage voisin. (photo 33).

MODELE EXPERIMENTAL A ANTIGENE FIXE
ET DEVENIR DES ANTIGENES POLLINIQUES

De l'étude de cette longue séquence d'évènements cellulaires, qui vont de quelques minutes à vingt-sept jours de contact entre antigène particulaire et cellules de la muqueuse nasale, il résulte un certain nombre de faits.

Ce type de modèle, qui peut être qualifié de modèle expérimental à antigène fixe (et c'est, à notre connaissance, le seul modèle immunologique de ce type) pose précisément le problème du devenir de l'antigène pollinique :

- a) au quinzième jour, nous n'avons retrouvé qu'une petite quantité de pollen dont tous les grains offraient une coque intacte et se situaient dans l'épaisseur de la muqueuse ;
- b) au vingt-septième jour de contact, au contraire, sous une muqueuse apparemment reconstituée, nous avons retrouvé des coques polliniques en voie de destruction, de fragmentation, mais qui toutes étaient situées dans le chorion.

Ces faits morphologiques permettent d'avancer l'hypothèse suivante :

- a) aussi longtemps que les protéines antigéniques contenues dans la coque diffusent dans l'atmosphère cellulaire de voisinage (et cette très lente injection-retard dure de dix à quinze jours), le grain, entouré par des macrophages, bloque, du fait de la toxicité des réactions immunologiques qui se poursuivent, la régénération des cellules de la muqueuse et de la sous-muqueuse. Aux environs du quinzième jour, deux mécanismes différents sont possibles suivant la localisation de l'antigène. Si celui-ci est situé dans l'épaisseur de la muqueuse, il est vraisemblable que la

coque vide est rejetée intacte dans la filière des fosses nasales du fait du renouvellement de la muqueuse qui retrouve son rythme normal. On sait, en effet, que l'épithélium de la muqueuse se renouvelle rapidement à l'état normal et que les cellules ciliées constituant la surface libre desquament très aisément, les cellules des couches profondes assurant leur remplacement.

Par contre, lorsque les grains de pollen ont pénétré plus profondément, c'est-à-dire lorsqu'ils sont enchâssés dans le chorion, un tel mécanisme ne peut s'appliquer et les modifications morphologiques que nous avons observées après vingt-sept jours de contact, indiquent que la coque du pollen de bouleau est soumise à un processus de dégradation enzymatique, auxquelles s'ajoutent des pressions d'origine cellulaire aboutissant à sa fragmentation. Cette dernière se poursuit probablement jusqu'à ce que les différents fragments soient susceptibles d'être phagocytés. Le processus total est certainement très long, tout au moins en ce qui concerne une structure aussi dure que l'est la coque du pollen de bouleau, il doit s'étendre jusqu'à quarante jours environ après le premier contact. Il fait, en outre intervenir un processus de dégradation enzymatique ; aucune enzyme connue n'étant susceptible de provoquer la lyse de la coque du pollen de bouleau qui, rappelons-le, est un de ceux qui est utilisé par les paléo-palynologistes pour dater les sédiments.

Le problème du mécanisme de disparition des coques polliniques dans la muqueuse nasale nécessite, à l'évidence, de poursuivre dans cette voie l'étude du modèle expérimental à antigène fixe.

Outre les renseignements concernant la coque du pollen, la microscopie électronique a permis une analyse séquentielle des interactions entre les cellules et l'antigène, la séquence temporelle des évènements peut se résumer comme suit.

- de la première à la dixième minute, arrêt du mouvement ciliaire et destruction des cils vibratiles ;
- de la vingtième à la trentième minute, pénétration du grain de pollen dans l'épaisseur de la muqueuse, ou même au-delà de cette dernière, par destruction progressive des cellules épithéliales ;
- de la trentième minute à deux jours, afflux des polynucléaires, en particulier éosinophiles, surtout abondants durant les vingt-quatre premières heures, puis des macrophages ; la destruction cellulaire rapide se poursuit ;
- du deuxième au huitième ou dixième jour, les macrophages, tout en continuant de subir une destruction dont la rapidité diminue progressivement, enserrant étroitement le grain de pollen ; l'évacuation du contenu pollinique, commencée probablement dès les premières minutes, se poursuit jusqu'à la fin de ce stade ;
- du dixième au quinzième jour, persistance d'une activité macrophagique importante, fin de l'évacuation du contenu pollinique, apparition de cellules plasmocytaires autour du grain et au voisinage immédiat des macrophages ; ces cellules offrent des signes d'intense activité élaboratrice ;
- du quinzième au vingt-septième jour, la réalité de l'activité plasmocytaire se confirme, elle se développe considérablement durant cette période en contact intime avec les cellules macrophages qui continuent d'enserrer la coque pollinique. Ces dernières cellules présentent une modification structurale : leur appareil ergastoplasmique est plus riche que ne l'est celui des macrophages constatés précédemment. Durant cette période débute également la fragmentation progressive de la coque vidée de son contenu, fragmentation qui n'est possible que par une lyse progressive des structures de l'exine et de l'intine.

Il convient de signaler que si la présence de macrophages et de plasmocytes était bien connue au niveau des organes immunologiques les plus importants (rate, ganglion lymphatique, moelle), leur présence et leur renouvellement rapide au niveau de la muqueuse n'étaient pas aussi classiques. Ceci tend à prouver que la réaction immunitaire est partout égale à elle-même et qu'elle peut intéresser, au premier chef, les tissus où pénètrent d'abord l'antigène, puis, secondairement seulement, le système lymphatique et hématopoïétique. Ceci pose, nous le verrons, le très important problème de l'autonomie immunologique de la muqueuse nasale.

Notons, par ailleurs, que la succession des différents types cellulaires s'effectue, dans le cas du modèle à antigène fixe qui nous occupe, de façon très lente. Ce fait prouve qu'aussi longtemps que l'antigène est injecté au sein des tissus, seules les cellules macrophages et, à moindre degré, les polynucléaires éosinophiles et neutrophiles sont capables de métaboliser les protéines antigéniques. L'ensemble du déroulement "au ralenti" du choc anaphylactique est entièrement en faveur de la théorie séquentielle de l'élaboration des anticorps qui reconnaît aux macrophages et, à moindre degré, aux polynucléaires (en particulier éosinophiles), le rôle d'endocytose, puis, secondairement après passage direct de matériel aux plasmocytes, assigne à ces derniers le rôle d'élaboration des chaînes globuliniques d'anticorps (THIERY J.P. 1968).

D'un point de vue technique général, l'étude dont nous venons de rapporter les résultats démontre que l'on peut retrouver un antigène particulière enchâssé dans l'épaisseur d'une muqueuse vivante durant un laps de temps allant d'une heure à vingt-sept jours après pénétration. Les possibilités ainsi offertes d'étudier *in vivo* la séquence des interactions entre antigène et cellules sont susceptibles de compléter les techniques immunologiques de culture cellulaire. Sous cet angle, les structures anatomiques du

nez peuvent être considérées, à la fois, comme chambre et milieu de culture. En effet, grâce à la résistance naturelle de la muqueuse nasale des mammifères aux infections microbiennes, il suffit d'un minimum de précautions opératoires pour assurer l'asepsie indispensable (nous n'avons jamais observé le développement d'une infection microbienne susceptible de gêner le déroulement de l'expérience).

Il est évident, en outre, que le milieu de culture constitué par la muqueuse nasale vivante est bien supérieur, du point de vue de la trophicité cellulaire et de l'armement enzymatique, aux milieux de culture actuellement réalisables *in vitro*.

ETUDE DU COMPORTEMENT DES GRAINS DE POLLEN
EN CHAMBRE DE CULTURE

Nous avons constamment souligné le caractère, à la fois aigu et subaigu, que revêt sur le plan tissulaire la crise d'anaphylaxie nasale déterminée par le pollen. Le développement subaigu de cette crise tient à l'effet "d'injection-retard" que détermine la structure du pollen.

L'étude précédente a permis de suivre la perte progressive de substance subie par le grain de pollen, mais elle ne précise, cependant pas les modalités du phénomène. L'étude en chambre de culture, du type Sykes-Moore, nous a permis de suivre ce mécanisme.

Nous avons, à cet effet, utilisé deux préparations différentes du même pollen de *Betula alba* :

- a) du pollen normal, c'est-à-dire traité et conservé à sec;
- b) du pollen fluorescent, c'est-à-dire traité par une solution d'isothiocyanate de fluorescéine, selon la technique suivante: (photo 38).

Cent milligrammes de grains de pollen desséché sont traités par cinq millilitres de tampon carbonate-bicarbonate à pH 9 et cinq millilitres d'acétone mélangés à deux milligrammes et demi d'isothiocyanate de fluorescéine. La réaction est menée à quatre degrés, durant douze heures, sous agitation modérée. Afin d'éliminer au maximum l'isothiocyanate de fluorescéine non fixé sur les protéines polliniques, sept lavages successifs sont effectués dans un mélange, à parties égales, d'eau physiologique et d'acétone. On obtient ainsi, après centrifugation, un culot formé de grains de pollen fluorescents.

En fait, seule la fraction protéique à l'intérieur du grain (et non la coque) est devenue intensément fluorescente. Cette

préparation est conservée à froid dans le noir et dans un milieu liquide constitué, par parties égales, d'eau physiologique et d'acétone afin d'éviter la solubilisation des substances protéiques, qui se produirait en milieu simplement aqueux.

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié le rôle de l'imbibition dans l'extrusion du contenu pollinique. Dans ce but, le pollen fut projeté sur une lamelle, recouverte d'une fine couche de plasma humain coagulé, qui fut placée en chambre de Sykes-Moore dans laquelle fut injecté du liquide de Eagle renfermant par millilitre :

- deux mille unités de pénicilline ;
- 0,02 gramme de streptomycine.

Sans ces précautions, en effet, le pollen, bien que desséché, ne serait pas stérile et pourrait provoquer le développement de contaminations variées rendant discutables ou masquant complètement les résultats observés. En de telles conditions d'imbibition maxima du grain de pollen, placé à 37°, nous n'avons jamais observé de modifications notables de son aspect morphologique, et ceci, dans la limite de soixante-douze heures que nous avons estimé suffisantes.

Dans une seconde série d'expériences, les grains de pollen furent mis au contact, non plus avec un caillot de plasma, mais avec la surface de la muqueuse nasale de cobayes ou de rats. A cet effet, le septum nasal de ces animaux anesthésiés fut prélevé (la muqueuse demeurant adhérente aux deux faces de la cloison cartilagineuse) stérilement, puis lavé dans du liquide de Eagle pour éliminer toute trace de sang à la surface de la muqueuse. En chambre stérile, la muqueuse fut ensuite découpée en rectangles de quinze millimètres sur dix, environ. Sur la surface libre, c'est-à-dire ciliée, de chacun de ces rectangles de muqueuse fut déposée une quantité aussi minime que possible de grains de pollen (une

cinquantaine environ), puis les préparations, après fermeture de la chambre, furent enfin recouvertes de liquide de Eagle. Nous avons mis en contact :

- 1) une muqueuse provenant d'un cobaye ou d'un rat non sensibilisé avec le pollen traité par l'isothiocyanate de fluorescéine ;
- 2) une muqueuse provenant d'un cobaye sensibilisé avec le pollen traité par l'isothiocyanate de fluorescéine ;
- 3) une muqueuse provenant d'un animal sensibilisé avec le pollen normal (c'est-à-dire desséché, mais non traité par l'isothiocyanate) ;
- 4) une muqueuse provenant d'un animal non sensibilisé avec le pollen normal .

Les chambres de Sykes-Moore étant mises à l'étuve à 37°, chacune de ces muqueuses est surveillée tous les quarts d'heure, durant les deux premières heures, puis toutes les sept heures.

Dans ces conditions, nous avons pu à nouveau vérifier que le battement ciliaire cesse effectivement autour des grains de pollen mis en contact avec une muqueuse sensibilisée dans un laps de temps compris entre quinze et trente minutes (un délai légèrement plus long que celui observé *in vivo*). Par contre, le mouvement ciliaire ne subit aucune modification, durant plusieurs heures, lorsque le pollen est mis en contact avec une muqueuse provenant d'animaux non sensibilisés.

Dans tous ces cas et du fait que les muqueuses sont immergées durant l'observation, les grains de pollen demeurent immobiles et ne sont pas propulsés par le battement ciliaire. Rien n'a été décelé au niveau du grain de pollen durant les six à huit premières heures. Passé ce délai, le contenu des grains situés au contact des muqueuses sensibilisées commence à se vider, la coque demeurant toujours parfaitement intacte. Il s'agit d'une extrusion de la substance du grain de pollen qui passe par les pores

de la coque, normalement destinés à laisser passer les stôlons. Ce phénomène fut observé, aussi bien au niveau des grains non traités, en utilisant un éclairage en contraste de phase, qu'au niveau des grains rendus fluorescents, en se servant d'un éclairage en lumière ultra-violette. Rien de semblable n'est constaté au niveau des préparations qui mettent en contact, dans les mêmes conditions, grains de pollen et muqueuse non sensibilisée et ceci durant les soixante douze heures d'observation.

Apparemment donc, seuls les grains mis en contact avec une muqueuse sensibilisée se vident partiellement de leur contenu cellulaire. A ce propos, il convient de noter que tous les grains ne réagissent pas de façon absolument semblable; environ 30 % échappent à l'élimination de leur contenu, et sur les 70 % qui restent, le phénomène, bien qu'aisément constaté, ne revêt pas toujours la même intensité. Dans les cas les plus nets, il s'échappe des pores une sorte de panache de substance pouvant atteindre cinquante microns de longueur sur cinq à vingt de large. Lorsqu'elle se vide plus complètement, ce qui est très rare, la coque du pollen devient optiquement transparente, aussi bien en lumière visible qu'en lumière fluorescente, ce qui prouve que seules les substances protéiques du grains, et non la coque, sont colorées par l'isothiocyanate de fluorescéine. Ces diverses constatations expérimentales peuvent se résumer ainsi :

le grain de pollen ne paraît se vider que s'il est mis au contact d'une muqueuse sensibilisée. Preuve supplémentaire qu'il s'agit là d'un phénomène immunologique nous a été fournie, non plus par la mise en contact de grains avec la muqueuse, mais en les plaçant dans des chambres de culture renfermant du sérum provenant soit d'un animal sensibilisé, soit d'un témoin. Seuls les grains placés au contact du sérum anti-pollen de bouleau se vidèrent de leur contenu de façon apparente (Photo 11).

Ce résultat ne signifie nullement que dans un liquide ne contenant pas d'anticorps (telle l'eau distillée ou encore un sérum normal) les pores du grain, dont nous avons vu précédemment la structure, ne s'ouvrent pas ; bien au contraire, dans un tel milieu aqueux, ils le font très rapidement, mais alors le contenu du grain est

solubilisé et se répand dans le milieu. Simplement, ce phénomène est optiquement invisible et des dosages de protéines sont nécessaires pour le mettre en évidence. Par contre, en présence d'une solution contenant des anticorps, la combinaison de ces derniers avec l'antigène entraîne la précipitation du complexe antigène-anticorps. Cette réaction est des plus classiques en immunologie, mais, à notre connaissance, c'est la première fois qu'elle est signalée dans ces conditions expérimentales particulières. La réalité du mécanisme de dilution-précipitation de l'antigène, aboutissant à l'effet injection-retard intra-tissulaire (déjà identifié sur des bases purement morphologiques) est ainsi démontrée.

La microscopie électronique en technique de balayage "scanning" rend ce phénomène visuellement évident. Il ne nous a pas été possible de savoir si la cinétique de la dilution et du passage dans le milieu extérieur du contenu pollinique était différente en présence d'un liquide contenant des anticorps de ce qu'elle est en présence d'un liquide n'en comportant pas. (photo 6).

Nous avons tenté, sur un petit nombre d'exemples, d'établir une corrélation entre l'apparition de la précipitation du contenu pollinique en chambre de culture et le taux d'héماغglutination trouvé pour le même sérum. Nous n'avons qu'un trop petit nombre de cas pour pouvoir établir une statistique. Néanmoins, en première analyse, cette corrélation s'établirait aux alentours d'une valeur de dilution de 1/64 en héماغglutination. Ce qui signifie qu'un sérum donnant un résultat positif pour cette valeur fournit, sans dilution, l'image de l'extrusion du matériel pollinique immédiatement précipité à la sortie du pore. Le même sérum, dilué à moitié, ne fournit plus de telles images, il s'agit donc d'une réaction immunologique assez peu sensible. En outre, il s'agit d'une réaction de précipitation ne nécessitant pas la présence du complément, fraction sérique très abondante dans le sérum du cobaye, qui nous sert d'animal d'expérience. En effet, la réaction de précipitation en chambre de culture se produit encore si l'on

met en présence pollen et anti-sérum préalablement chauffé à 56° durant trente minutes (chauffage qui, sans altérer les gamma globulines, permet de détruire l'activité du complément).

Cette étude des réactions entre le pollen de bouleau et différents milieux contenant des anticorps peut être rapprochée de celle, déjà ancienne, de GUTMANN M.J. (1933), qui rapporte la destruction de pollen par les sécrétions nasales de sujets allergiques.

CORRELATION ENTRE LES TESTS IMMUNOLOGIQUES

Ces premiers résultats nous ont incité à tenter d'établir des corrélations plus générales entre l'anaphylaxie nasale au pollen et les tests classiques utilisés depuis longtemps dans l'étude des réactions immunitaires. Bien que la muqueuse des voies aériennes supérieures soit la zone de pénétration de tous les allergènes aériens, seules, jusqu'ici, les réactions cutanées (et, à un moindre degré, oculaires) ont fait l'objet d'études précises et ont permis l'établissement de tests classiques, dont certains ont d'autant plus de valeur que leurs résultats peuvent être mesurés quantitativement. C'est, en particulier, le cas pour le test d'anaphylaxie passive, ou test d'Ovary, que nous avons adopté pour mettre en évidence les anticorps circulants anti-pollen.

Test d'Ovary

La technique de ce test est classique :

après rasage de la peau du ventre de quatre cobayes blancs normaux, chaque animal reçoit une injection, par voie intra-dermique, de dilutions allant de 1 à 1/200 d'un mélange de sérum d'animaux appartenant à deux séries précédemment immunisées. Ce mélange de huit sérums donne la certitude d'obtenir la valeur moyenne du taux d'anticorps circulants, chez le cobaye.

Trois heures plus tard, est injecté dans la circulation générale, par la voie de la jugulaire interne, un mélange, à proportions égales, d'un extrait aqueux de pollen (1 pour 200) et d'une solution, en sérum physiologique, de bleu d'Evans. Une demi-heure après, les résultats sont lus sur la partie profonde du derme de la peau de l'abdomen, préalablement disséquée et retournée. Nous avons obtenu des résultats positifs avec des dilutions allant jusqu'au 1/100 du sérum anti-pollen.

Ce fait prouve deux choses :

- 1) l'extrait aqueux de pollen injecté contient en solution des molécules susceptibles de provoquer un choc anaphylactique ;
- 2) la teneur en anti-corps circulants, provoqués par la sensibilisation au pollen telle que nous l'avons effectuée, atteint ou dépasse un microgramme pour les quantités de sérum injecté, teneur exprimée en azote protéique.

La positivité de ce test résulte du fait que l'antigène, en se combinant avec les anticorps sériques, provoque localement une augmentation de la perméabilité capillaire. Nous avons tenté d'appliquer ce test à la muqueuse nasale.

Dans une première série d'expériences, nous avons pratiqué (selon les techniques opératoires déjà décrites), sur quatre cobayes normaux, deux ouvertures (chacune de deux à trois millimètres de diamètre) situées de chaque côté de l'arête nasale, les deux orifices étant décalés en hauteur l'un par rapport à l'autre. A l'aide de deux aiguilles à injection intra-dermique du plus fin calibre, furent effectuées :

- d'un côté, une injection (dans la muqueuse septale) de 1/10 de millilitre d'anti-sérum (même mélange que précédemment) ;
- de l'autre côté, comme témoin, une injection de la même quantité d'eau physiologique.

Deux heures après, l'animal recevait, par injection intra-veineuse, un millilitre au total d'une solution d'extrait de pollen et de bleu d'Evans. Vingt minutes plus tard, l'animal était sacrifié. La positivité du test est mise en évidence par la coloration bleue que revêt la muqueuse sur quelques millimètres carrés autour du point d'injection. L'autre côté du septum, servant de témoin (après injection d'eau physiologique), apparaît normal.

Il est cependant évident que l'injection dans un tissu aussi richement vascularisé et innervé que la muqueuse nasale peut provoquer, non seulement une hémorragie locale, mais des troubles vaso-moteurs susceptibles d'altérer les résultats expérimentaux.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons tenté de réaliser la transmission passive, non plus par injection, mais par instillation nasale du même anti-sérum précédemment utilisé. Cette instillation d'un millilitre fut effectuée par une ouverture unilatérale, pratiquée au niveau des os propres du nez. Puis, six heures plus tard, les animaux reçurent, comme pour la première série d'expériences, une injection par voie intra-veineuse d'un extrait de pollen (1/200) et de bleu d'Evans en sérum physiologique.

Les résultats observés sont comparables aux précédents. Une demi-heure plus tard, le septum disséqué révèle du côté instillé, une coloration bleue plus diffuse que celle résultant d'une injection intra-muqueuse, mais nette, cependant, au niveau de la zone qui fut directement intéressée par l'instillation. Ce résultat indique que les anticorps instillés sont susceptibles non seulement de se combiner avec les structures superficielles de la muqueuse, mais également de pénétrer jusqu'à la couche des capillaires immédiatement sous-jacents, et qu'à ce niveau, leur concentration est suffisante pour provoquer des altérations entraînant la diffusion du colorant injecté par voie veineuse.

Dans une troisième série d'expériences, quatre cobayes reçurent, par voie narinaire (sans autre intervention), le même sérum provenant de cobayes sensibilisés au pollen. Quatre instillations furent faites en douze heures; dix heures plus tard, les animaux reçurent une pulvérisation nasale de pollen desséché et furent sacrifiés une demi-heure plus tard. (photo 10).

Les coupes des prélèvements étudiés histologiquement, en microscopie optique uniquement, révélèrent que les grains de pollen avaient détruit la bordure ciliée de la muqueuse et profondément déprimé

"en coup de poing" les cellules épithéliales. Mais, à la différence de ce que l'on observe en cas de choc anaphylactique, les cellules au point d'impact n'étaient pas détruites. En outre, faits caractéristiques :

- a) les grains de pollen déprimant la muqueuse étaient moins nombreux que ceux qui la pénétrèrent en cas de choc anaphylactique ;
- b) les grains étaient étroitement groupés, par amas de trois ou quatre.

L'anaphylaxie passive détermine donc, histologiquement, l'aspect d'un choc anaphylactique à minima ; nous n'avons, en particulier, jamais constaté une destruction extensive de la bordure ciliée, ni de modifications des couches profondes de la muqueuse ou de la sous-muqueuse.

Ce test ne revêt pas la même valeur que celui d'Ovary, qui prouve que le complexe antigène-anticorps augmente la perméabilité de la paroi des capillaires à tel point que les particules de bleu d'Evans, injectées par voie veineuse, se répandent dans l'atmosphère tissulaire environnante. Le test précédent apporte la preuve que les molécules d'anticorps demeurent (au moins en partie) *in situ* et que la réaction antigène-anticorps, bien que de cytotoxicité limitée, détruit les structures protéiques les plus exposées de la cellule, c'est-à-dire les structures ciliées. Cette disparition locale des cils vibratiles, ici comme en cas de choc anaphylactique direct, apparaît comme la preuve cytologique majeure de la réalité de la réaction antigène-anticorps ; elle permet le contact intime de l'allergène avec la surface cellulaire libre. Quant à l'adhésivité qui se traduit par la présence d'une fine pellicule anhiste unissant le pollen aux cellules, elle est assurée par le précipité antigène-anticorps, précipité dont nous avons vu déjà la réalité.

MISE AU POINT ET ETUDE D'UN "POLLEN ARTIFICIEL"

Le fait de la pénétration intra-muqueuse du grain de pollen peut constituer par sa constance, sa reproductibilité, son évidence histologique, un nouveau test d'étude de l'allergie nasale, en particulier dans l'identification des fractions antigéniques et au cours d'études pharmacologiques. Il nous est cependant rapidement apparu, que les pollens, s'ils avaient pu nous permettre d'affirmer la réalité du phénomène de pénétration, n'étaient pas adaptés à la poursuite de l'étude dans les voies précédemment indiquées et qu'il était nécessaire de disposer d'un modèle expérimental plus simple. En effet, la très grande complexité chimique du pollen, les difficultés rencontrées pour extraire complètement les fractions protéiques, spécialement lorsque la coque est à peu près chimiquement indestructible, rend ce matériel inadéquat. Il est, d'autre part, évident qu'on ne peut faire appel à un allergène sous forme liquide pour effectuer des tests histologiques et histochimiques de pénétration intra-épithéliales lors du choc anaphylactique. Sous forme liquide, en effet, l'antigène provoque des altérations histologiques trop diffuses pour se prêter à une confrontation cyto-immunologique.

Choix du substrat

La poursuite de notre étude nécessitait donc la mise au point d'un substrat capable d'adsorber les antigènes et de se comporter comme un vecteur inerte de leurs propriétés immunologiques, assurant ainsi la possibilité de choc anaphylactique.

Dans le détail, ce substrat devait posséder un certain nombre de qualités indispensables.

- 1) Ses dimensions ne devaient pas dépasser celles d'un grain de pollen de bouleau, qui sont, en effet, optima d'après nos constatations expérimentales et ne sauraient être sensiblement dépassées ;
- 2) ses dimensions ne devaient pas, non plus, être inférieures à trois microns, sinon le test de pénétration intra-muqueuse perdait toute signification immunologique ;
- 3) le substrat choisi devait avoir une forme sphérique aussi semblable que possible à celle des grains de pollen et surtout n'offrir aucune aspérité pouvant faire accuser une déchirure tissulaire mécanique de favoriser la pénétration intra-muqueuse ;
- 4) par ailleurs, ce substrat ne devait modifier en aucune manière la physiologie de la muqueuse nasale, ne provoquer, en particulier, aucune irritation à ce niveau ; en d'autres termes, il devait se comporter comme un vecteur parfaitement neutre, étant normalement capté par le "tapis roulant" du mucus et balayé par le mouvement ciliaire, comme toutes les poussières et particules continuellement inhalées ;
- 5) au surplus, la substance destinée à jouer le rôle de pollen artificiel devait pouvoir être sectionnée par les différents couteaux utilisés aussi bien en microscopie optique qu'électronique.

Nous avons essayé, sans obtenir de résultats satisfaisants, un certain nombre de matériaux, notamment :

- des grains de latex, utilisés en immunologie pour adsorber des antigènes dans les tests de floculation ou d'agglutination ; mais leurs dimensions ne dépassent pas deux microns ;
- de la poudre de cellulose, mais elle n'offre pas une homogénéité suffisante.

Choix d'une résine échangeuse d'ions

Nous avons pu, enfin, nous procurer une résine échangeuse d'ions, dont les caractéristiques physico-chimiques répondent aux nécessités énumérées ci-dessus. Il s'agit d'une résine commercialisée par la Société TECHNICON et qui est généralement utilisée pour la mise en évidence, par chromatographie, des acides aminés et des guanidines. Cette résine est désignée sous le nom de "Chromobeads type A" et se présente sous forme de grains calibrés de 23 microns $\pm$ 1,5. Elle est de type cationique, constituée par du polystyrène sulfoné possédant 4 % de chaînes latérales en divinyl benzène, son groupe actif est le groupe SO_3H qui possède un haut pouvoir d'échange, en particulier pour les peptides. Soixante résidus peptidiques peuvent être fixés par chaque molécule de polystyrène, mais le fabricant n'indique pas le poids moléculaire maximum des protéines susceptibles d'être adsorbées.

La vérification de la taille des grains sphériques constituant cette résine révéla que leur calibrage était parfaitement standardisé, à l'exception rencontrée environ une fois sur cent d'une sphère beaucoup plus grosse, d'environ cent microns de diamètre, mais ce fait est évidemment négligeable et ne pouvait altérer nos résultats expérimentaux. Il convenait, dès lors, de s'assurer que cette résine, mise au contact de l'épithélium cilié de la muqueuse nasale des mammifères, se comportait comme un substrat inerte. Nous en avons instillé, sous forme sèche, une quantité aussi importante que possible (certainement plusieurs milliers de grains dans chaque narine) à cinq animaux normaux et à cinq animaux sensibilisés au pollen de bouleau, qui furent tous sacrifiés deux heures après ces instillations.

Pénétration intra-muqueuse de la résine

L'étude histologique fut effectuée en microscopie optique, en examinant systématiquement la muqueuse au niveau du tiers antérieur, du tiers moyen et du tiers postérieur des fosses nasales. Cette étude permet de relever deux faits qui, l'un et l'autre, sont la conséquence des instillations particulièrement massives de résine :

1) en de très rares cas, la muqueuse est déprimée en une bourse où la sphère de résine s'enclasse, mais cette pseudo-inclusion se distingue de la véritable pénétration, d'une part, parce qu'il n'y a pas rupture de continuité de la muqueuse, d'autre part, parce que le revêtement ciliaire demeure intact au niveau du grain de résine, même lorsque celui-ci déprime la muqueuse ;

2) quelques signes banaux d'irritation constatés au niveau de la filière nasale, en particulier de légères hémorragies coexistant avec des aspects limités de desquamation de la muqueuse. Il convient pour diminuer ce dernier phénomène de toujours laver la résine dans un tampon phosphate de pH 7 à 7,4 avant emploi.

Nous avons ensuite étudié le comportement de la résine préalablement mise en contact avec un extrait aqueux de pollen, puis instillée par voie nasale. A cet effet, on met en contact, durant une heure sous agitation modérée, à température du laboratoire, 150 milligrammes de résine, préalablement lavée dans un tampon pH 7,4 avec 4 millilitres d'une solution aqueuse d'extrait de pollen. Cette solution fut préparée par contact, durant une heure, de 25 milligrammes de pollen desséché dans 5 millilitres d'eau bidistillée, et enfin filtrée sur papier. La suspension de résine est filtrée et la résine recueillie sur papier est reprise par un millilitre d'eau physiologique. Chaque animal reçoit en instillation deux gouttes de cette suspension dans chaque narine.

Dans ces conditions expérimentales, nous avons constaté que, chez les cobayes sensibilisés, des grains de résine ainsi préparés pénétraient au sein de la muqueuse nasale de façon analogue au pollen.

Les procédés d'obtention de ce pollen artificiel furent étudiés, particulièrement en ce qui concerne la préparation de l'extrait pollinique et les modalités de contact entre cet extrait et la résine. Le pollen fut broyé au mortier dans du sable de Fontainebleau, puis mis en suspension et filtré. Les modalités furent diversifiées :

- contact à froid et à 40° ;
- utilisation de différents types de tampons de pH neutre ;
- dessiccation de la résine après contact et insufflation nasale à sec.

Les résultats obtenus, après ces différentes modifications techniques, furent comparables à ceux fournis par la technique initiale que nous avons décrite. En raison de sa simplicité, c'est donc celle-ci que nous avons désormais constamment utilisée.

La constatation expérimentale de la pénétration de la résine dans la muqueuse sensibilisée ouvrait certaines voies de recherche. Parmi celles-ci, nous en avons choisi trois :

- la première consiste, par différentes techniques biochimiques, à isoler des fractions d'extrait de pollen et à rechercher celle capable d'assurer la pénétration intra-tissulaire du grain de résine ;

- la seconde a pour but d'analyser les résultats histologiques et cytologiques de cette pénétration et de ce séjour au sein de la muqueuse et de les comparer avec ceux observés en présence du pollen ;

- la troisième consiste à tenter de mettre au point d'autres modèles de vecteurs d'antigènes.

MISE EN EVIDENCE D'UNE FRACTION DE L'ANTIGENE POLLINIQUE
RESPONSABLE DU PHENOMENE DE DESTRUCTION CELLULAIRE
ABOUTISSANT A LA PENETRATION INTRA-MUQUEUSE

Cette recherche d'une fraction protéique active, effectuée grâce à la collaboration de M. Donald HAYES (Maître de Recherche au C.N.R.S. - Laboratoire de M. le Professeur François GROS), peut être divisée en deux parties :

- 1) une première série d'expériences de caractère préliminaire ;
- 2) une deuxième série d'expériences qui permet, grâce aux tests cytologiques constitués par la destruction de la bordure ciliée et la pénétration intra-muqueuse de la résine, d'identifier une fraction biochimique active dans l'extrait de pollen.

(Afin de ne pas alourdir l'exposé, les données techniques concernant l'étude biochimique seront indiquées en notes infrapaginales).

Etudes de caractère préliminaire

Elles ont porté sur :

- a) la cinétique de l'extraction des protéines du pollen ;
- b) les conditions physico-chimiques optima de cette extraction ;
- c) les techniques utilisables pour fractionner les extraits obtenus.

a) L'étude de la cinétique de l'extraction (1) aqueuse de la substance pollinique fut effectuée en comparant les résultats fournis par des extractions durant 5 minutes, 10 minutes, 30 minutes et 16 heures. La valeur des protéines extraites fut mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 260 millimicrons. Il convient de noter, à propos de ce premier résultat, la rapidité de l'extraction protéique réalisée, puisqu'elle atteint en 10 minutes une valeur qui ne sera pas doublée en 16 heures.

On peut déduire de ce dosage que les pores du pollen, normalement obturés, on l'a vu, par une série de lamelles qui naissent de l'intine, s'ouvrent immédiatement en milieu aqueux, le délai ne doit pas dépasser la minute. Ce fait concorde avec la rapidité ou même le caractère véritablement explosif des dégâts cellulaires dont les premiers sont constatés *in vivo* moins de dix minutes après instillation de pollen sec dans les narines des animaux sensibilisés.

Enfin, l'application des résultats de ces dosages nous a permis d'abréger considérablement le temps nécessaire à l'extraction des antigènes du pollen: ce temps fut désormais fixé à 30 minutes.

Une seconde expérience, effectuée dans les mêmes conditions que précédemment mais où l'incubation fut remplacée par le broyage, nous permit de constater qu'après cinq minutes de broyage dans un appareil Virtis à 6.000 tours/minute à la température de 4°, on extrait une quantité de protéines analogue à celle extraite en 16 heures au cours de l'extraction précédente (densité optique 26 pour 25 milligrammes de pollen sec).

(1) Chaque extraction fut conduite sur une quantité de 25 milligrammes de pollen dans une solution aqueuse de cinq millilitres de tampon Tris 5×10^{-3} M et Mg 10^{-2} M de pH 7 à une température de 4°, sous agitation modérée et durant les laps de temps suivants : 5 minutes, 10 minutes, 30 minutes et 16 heures.

Admettant que les antigènes étaient, dans le cas qui nous occupe, de nature protéique, nous avons adopté comme valeur de mesure la densité optique de la solution à la longueur d'onde de 260 millimicrons. Cette longueur d'onde étant la valeur utilisée pour étudier les nucléo-protéines. Exprimées en valeur de densité optique, les différentes extractions obtenues donnèrent les résultats suivants: 14 - 17 - 17 - 25.

Une troisième expérience eut pour but de s'assurer des valeurs atteintes par l'extraction à la suite d'épuisements successifs (1). Ces trois extractions successives de la même suspension de pollen prouvent que l'extraction des substances protéiques est très rapide et que l'essentiel passe en solution en trente minutes, mais qu'apparemment, la technique du broyage à froid permet une extraction protéique plus totale.

En fait, la comparaison établie ultérieurement entre extraits obtenus par broyage à froid et ceux résultant de l'extraction en milieu aqueux ne révèle pas de différence sur le plan biologique et cette dernière technique en raison de sa simplicité fut celle généralement utilisée.

(1) Deux cent cinquante milligrammes de pollen sont mis en suspension dans cinq millilitres d'une solution de tampon Tris 5×10^{-3} M à pH 7,5 et $Mg\ 10^{-2}$ M (donc sans chlorure) pendant trente minutes en chambre froide.

L'extrait de quatre millilitres et demi obtenu présente au spectrophotomètre à 260 millimètres une densité optique de 137.

Dans les mêmes conditions techniques sont effectuées :

- une deuxième extraction sur le même pollen avec cinq millilitres du même tampon qui fournit un extrait offrant une densité optique de 42 millimètres
- puis enfin, une troisième extraction donnant un extrait d'une valeur de densité optique de 26

Le total est donc de 205, inférieur à celui obtenu lors de l'expérience n° 2 qui était de 26 pour 25 milligrammes, soit 260 pour 250 milligrammes.

b) Pour les essais de fractionnement biochimique des extraits obtenus, les expériences de fractionnement ont utilisé, tout d'abord, la technique d'*ultracentrifugation en gradient de sucrose* (1). Cette méthode fut abandonnée car elle s'avère incapable de fragmenter les produits extraits absorbant la lumière ultra-violette. En effet, le pic d'absorption fut retrouvé dans tous les cas au niveau du dernier tube recueilli, ce qui signifie que les produits dans ces conditions ne sédimentent pas et sont donc de faible poids moléculaire.

Le fait que la masse principale de l'extrait protéique par ultracentrifugation en gradient de sucrose ne sédimente pas nous a conduit à l'abandon de cette technique sur le plan biochimique et à l'utilisation de méthodes différentes pour séparer les fractions destinées à être soumises à la vérification des tests cytologiques.

(1) Un premier extrait obtenu par broyage dans l'appareil Virtis fut soumis à l'ultracentrifugation pendant 20 heures dans un gradient de sucrose de 5 à 20 %, puis tamponné par 0,1 NaCl Tris 5×10^{-3} de pH 7,3 - rotor S.U. 20.000 à 25.000 tours/minute - Trente deux fractions furent recueillies selon la technique habituelle, la fraction numéro 1 étant celle occupant le fond du tube. Les trente deux fractions recueillies furent analysées au spectrophotomètre à 260 millimus et révélèrent que seule la fraction numéro trente offrait un pic d'absorption protéique.

Une deuxième expérience fut effectuée à l'aide de l'extrait obtenu par épuisements successifs en milieu tamponné ; en ce dernier cas, le tampon ne contenait pas de chlorure de sodium.

Ces fractions furent soumises à une centrifugation en gradient de sucrose 5 à 20 % - 20.000 tours/minute, durant seize heures, tampon Tris $5 \times 10^{-3}M$ et Mg $10^{-2} M$ de pH 7,4 et trente deux fractions sont recueillies comme précédemment.

Les résultats sont comparables, en ce sens qu'un pic est noté au niveau du tube 32. On peut ainsi affirmer que les produits extraits qui entraînent une absorption en lumière ultra-violette ne sédimentent pas.

c) Nous nous sommes adressé à la technique de la *chromatographie sur colonne* (1) et ensuite à la *chromatographie sur papier*. Ces techniques se sont révélées comme permettant des fractionnements précis et dont le nombre et la variété mis en évidence par les dosages spectrophotométriques et chimiques (méthode de Folin) autorisaient leur emploi pour rechercher une fraction biologiquement active.

(1) Un gramme de pollen fut extrait par cinq millilitres de tampon Tris 5×10^{-3} M et Mg 10^{-2} M de pH 7,4

Après une demi heure de contact, le filtrat analysé par spectrophotométrie à 260 millimus révèle une densité optique de 410 et par la méthode de Folin fournit le chiffre global de 55 milligrammes de protéines totales. Cet extrait est passé sur colonne D E A E Serval (colonne de cellulose faiblement basique) préalablement lavée au tampon Tris. La colonne utilisée avait un diamètre de deux centimètres et une longueur de cinq centimètres. L'éluat est obtenu par lavage avec la solution tampon Tris HCl 5×10^{-3} M et Mg 10^{-2} M de pH 7,4.

Huit fractions, de sept millilitres chacune, sont ainsi recueillies et analysées spectrophotométriquement. Leur teneur en protéines est mesurée par la méthode de Folin. Les résultats furent les suivants :

Fractions	Densité optique 260 millimus	Mg protéines
1	4,2	1,4
2	2,8	1,5
3	43	13,4
4	136	16,5
5	88	13,3
6	18	2,7
7	6	1,5
8	5	1,0
Total	303	51,3

Ces résultats doivent être comparés aux données initiales obtenues par les mêmes dosages pour l'extrait total.

Cette comparaison révèle que la récupération de l'adsorption mesurée en densité optique à 260 millimus est environ de 75 % (400 - 303), alors que la récupération du dosage protéique est de 98 % (51,3 - 55).

La chromatographie sur papier (1), en particulier, a permis un fractionnement en 13 fractions différentes et cette technique fut retenue pour effectuer les premiers essais biologiques.

(1) 500 milligrammes de pollen sont extraits par deux millilitres tampon Tris, comme celui précédemment utilisé, pendant trente minutes à la température du laboratoire. L'extrait est chromatographié sur deux feuilles de papier Whatman, type 3 M M (non lavées préalablement) et coupées en bandes d'une longueur de 20 centimètres. Après développement dans du butanol saturé d'eau, ces bandes sont éluées douze heures dans du tampon Tris $Mg\ 10^{-4}\ M$ pH 7. On effectue alors, au niveau des éluats recueillis, une mesure de l'absorption dans l'ultra-violet et comparativement le dosage des protéines par la méthode de Folin.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

<u>N°</u> <u>de la bande</u>	<u>R.F.</u>	<u>D.260</u>	<u>Protéines</u> <u>totales</u>	<u>Aspect en</u> <u>ultra - violet</u>
1	0	41	6	-
2	0,03	7	17	-
3	0,05	3	6	-
4	0,08	4	4	forte fluores.
5	0,11	3	4	faible " "
6	0,13	4	3	faible absorp.
7	0,16	5	4	faible absorp.
8	0,24	100	26	forte absorp.
9	0,32	3	3	ni absorp. ni fluores.
10	0,36	7	4	faible absorp.
11	0,42	4	3	faible fluores.
12	0,70	18	9	
13	0,90	21	10	ni absorp. ni fluores.

Signalons que la bande n° 13 comportait des impuretés du papier, comme l'ont montré les essais effectués ultérieurement avec des papiers préalablement lavés.

Expériences visant à isoler une ou plusieurs fractions actives

Les expériences suivantes furent essentiellement destinées à isoler une ou plusieurs fractions dotées d'une activité antigénique. Chaque test fut conduit de la façon suivante :

- chaque fraction protéique de deux millilitres est mise en contact, durant trente minutes et à la température du laboratoire, avec cinquante milligrammes de résine polystyrène, la suspension est agitée toutes les cinq minutes ;
- après filtrage sur papier, la résine, reprise par un millilitre de tampon phosphate (ou Tris de pH 7,4), est immédiatement instillée dans les narines de cobayes sensibilisés suivant les modalités précédemment définies ;
- la positivité du résultat est fournie par l'étude histologique.

Nous avons considéré que le résultat était positif, et par voie de conséquence, que la fraction était antigénique, lorsqu'il était possible d'observer histologiquement une pénétration intra-muqueuse du grain de résine ou, au minimum, son accollement très intime avec l'épithélium, qui, dans ce dernier cas, est déprimé "en coup de poing". Mais surtout, dans tous les cas, la destruction ciliaire au niveau et au voisinage immédiat de l'impact constitue un élément essentiel du diagnostic et permet d'affirmer la réalité de la réaction antigène-anticorps.

Ces conditions histologiques sont, d'ailleurs, des conditions minima qui n'impliquent pas forcément l'identité complète entre les mécanismes qui président aux destructions provoquées par les instillations de pollen et ceux qui entraînent la pénétration des grains de résine.

Un certain nombre de données techniques furent constamment suivies lors de ces expériences :

- a) l'extraction des fractions du pollen fut faite sans broyage, en milieu aqueux, à la température de 4° et amenée à pH 7,4 par le tampon Tris précédemment défini ;
- b) les tests furent conduits (comme il est de règle actuellement, en particulier lors d'études pharmaco-dynamiques, en double insu (double blind test), c'est-à-dire que les différentes fractions isolées étaient numérotées dans un ordre quelconque et que leur nature demeurerait inconnue du biologiste. Les résultats biochimiques et histologiques étaient ensuite confrontés.

Notons d'emblée que les tests définis par la destruction des structures ciliées et par la pénétration intra-muqueuse du pollen artificiel ne furent jamais en défaut et fournirent des résultats sans ambiguïté

- Première expérience d'essai biologique

Un extrait de 0,7 millilitre est obtenu à partir de 200 milligrammes de pollen mis en suspension pendant trente minutes à 4° dans un millilitre de tampon 5×10^{-3} Tris à pH 7,4.

On répartit en trois parties aliquotes qui sont placées

chacune dans 4,8 millilitres d'un gradient de sucrose 5 - 20 %, tamponné à pH 7,4 - rotor S N 39 soumis à 30.000 tours/minute durant treize heures.

Sept fractions de chacune 0,7 millilitre sont recueillies.

La fraction n° 7, seule fraction supérieure, donc contenant les substances de poids moléculaire le moins élevé, s'est révélée active aux essais biologiques. Toutes les autres fournissent des résultats entièrement négatifs. Notons que cette fraction n° 7 est la même que celle désignée par les numéros 30 à 32 précédemment (cf. notes sur la technique de fractionnement par ultracentrifugation).

Ce résultat confirme deux faits :

- 1) la fraction active est la même que celle qui fournit un pic d'absorption dans l'ultra-violet ;
- 2) la méthode des ultracentrifugations ne peut être utilisée valablement pour pousser plus loin ce fractionnement, puisque le ou les corps actifs ne sédimentent pas ou très peu en gradient de sucrose, ainsi que nous l'avions indiqué précédemment.

- Deuxième expérience d'essai biologique

Elle fut destinée à combiner l'ultracentrifugation et le fractionnement chromatographique.

- Un gramme de pollen est mis en suspension à froid (4°) durant 30 minutes dans le tampon Tris à pH 7,4, généralement utilisé ;
- l'extrait aqueux de 6 millilitres obtenu est séparé en trois fractions de deux millilitres dans un gradient de sucrose 5 à 20 % durant dix huit heures à 25.000 tours/minute ;

- à l'issue de cette ultracentrifugation, les quatre millilitres supérieurs de chaque tube à centrifuger sont prélevés et mélangés ;
- dix millilitres de ce mélange sont fractionnés sur colonne D E A E Serval, lavés au tampon Tris 5×10^{-3} M à pH 7,4 et Mg 10^{-4} M -. La colonne utilisée avait un diamètre de deux centimètres pour une longueur utile de vingt centimètres.

Cette colonne est ensuite lavée avec :

- a) 30 millilitres de tampon Tris 5×10^{-3} M, pH 7,4 et Mg 10^{-4} M ;
- b) avec le même tampon, mais après addition de NaCl 0,125 M ;
- c) avec le même tampon, mais après addition de NaCl 0,25 M ;
- d) avec le même tampon, mais après addition de NaCl 0,5 M.

Ces éluats sont soumis :

- à l'analyse spectrophotométrique à la longueur d'onde de 260 millimicrons ;
- et à une analyse quantitative de leur teneur en protéines par la méthode de Folin .

: Eluats :	Valeur de la densité optique	: Teneur en protéines totales :
: N° 1 :	: 60 :	: 9,2 mg. :
: N° 2 :	: 100 :	: 15 mg. :
: N° 3 :	: 19 :	: 1,8 mg. :
: N° 4 :	: 6 :	: 0 :

L'essai biologique fut effectué sur trois animaux, les éluats n° 3 et n° 4, en raison de leur faible teneur en protéines, furent mélangés. Seul l'éluat n° 1 fournit un résultat positif.

On peut conclure de cet essai que le produit actif extrait par le tampon non chloruré est de faible poids moléculaire et qu'il est neutre ou basique.

- Troisième expérience de fractionnement biologique

Par cette expérience, nous avons tenté de combiner le fractionnement chromatographique et l'électrophorèse.

- 700 milligrammes de pollen sont extraits par un tampon 0,05 M acide acétique 0,01 M acide éthylène diamine tétracétique ;
- le volume de l'extrait, qui est de deux millilitres, fournit une densité optique de 276, à la longueur d'onde de 260 millimicrons.

Un millilitre est utilisé pour effectuer une électrophorèse sur papier, l'autre millilitre pour réaliser une chromatographie sur papier, conduite comme précédemment. L'électrophorèse est réalisée en tampon acide-acétique éthylène diamine tétracétique de pH 3,5, pendant trois heures, sous 2.800 volts, fournissant 90 volts au niveau du papier. Trois fractions électrophorétiques, numérotées 1, 2, 3, sont recueillies, la fraction n° 1 étant située immédiatement de part et d'autre de la ligne de départ, la fraction n° 2 comportant tout ce qui a migré vers l'anode et la fraction n° 3, ce qui a migré vers la cathode.

La chromatographie fournit quatre fractions numérotées 4, 5, 6, 7 ; la fraction n° 4 étant la plus proche de la ligne de départ et les autres s'en éloignant progressivement.

Sur chacune de ces fractions sont opérés :

- a) les dosages biochimiques ,
 - . mesure de la densité optique à la longueur d'onde de 260 millimicrons ;

- . dosage des protéines ;
- . dosage des hydrates de carbone par la méthode à l'anthrone en milieu acide ;

b) les tests biologiques,

après absorption sur résine de polystyrène, chacune des fractions est instillée par voie nasale à des cobayes sensibilisés, que l'on sacrifie trente minutes plus tard, ainsi qu'il a été indiqué précédemment.

Les résultats obtenus pour la mise en oeuvre de ces différentes méthodes furent les suivants:

<u>Fraction</u>	<u>D.O. 260</u>	<u>Mg protéine</u>	<u>Mg hydrates</u> <u>de C</u>	<u>Essai</u> <u>:biologique</u>
1	53	5	0,1	négatif
2	7,5	2,5	0,05	"
3	18	4,4	1,4	"
4	18	3,8	0,48	"
5	11	1,4	1,5	"
6	44	1,7	0,03	"
7	3	1	0	positif

Il convient, à propos de ces derniers résultats, de préciser un certain nombre de points. Notons, tout d'abord, que le résultat biologique n'est pas contradictoire avec le précédent et qu'une seule fraction se révèle active, il n'y a sous cet angle aucune ambiguïté. Seule la fraction n° 7, correspondant aux protéines qui migrent le plus rapidement lors de la chromatographie, entraîne une pénétration ou au moins un accollement net de la résine au niveau du point d'impact.

Nous n'avons pas obtenu de résultats avec les fractions fournies par l'électrophorèse, ce fait résulte certainement de leur faible poids moléculaire. Les protéines actives ayant migré hors des limites de l'électrophorèse n'ont pu être récupérées et échappèrent ainsi à l'expérimentation biologique. La spécificité du test biologique apparaît d'emblée excellente.

Quant aux conclusions que cette expérience permet de tirer sur le plan biochimique, on peut affirmer que la substance active, qui n'est pas retenue par la colonne de chromatographie, migre très rapidement. Elle est basique et non neutre, certainement de faible poids moléculaire et ne comporte aucune fraction hydro-carbonée.

- Quatrième expérience de fractionnement biologique

Poursuivant les tests biologiques et les fractionnements biochimiques, nous avons examiné, dans l'expérience suivante, si le produit actif isolé était dialysable, ce qui paraissait très probable au vu des résultats précédents. Par ailleurs, nous avons cherché à préciser le fractionnement par la méthode chromatographique sur papier.

A cet effet : 700 milligrammes de pollen sont extraits par 10 millilitres de tampon Tris (sans Mg) ;
2 millilitres et demi de l'extrait sont utilisés pour réaliser cette chromatographie ;
2 millilitres sont soumis à la dialyse.

La chromatographie est effectuée sur papier Whatman, comme pour l'expérience précédente. Elle permet de recueillir deux fractions d'importance inégale :

- une fraction A, la plus importante, qui correspond à celles numérotées 1, 2, 3, 4 précédemment ;
- une fraction B, celle qui migre le plus loin, qui correspond à peu près aux fractions 6 et 7 précédentes.

Ces deux fractions sont éluées, puis lyophilisées afin de les conserver plus aisément.

La dialyse est conduite avec deux millilitres de l'extrait de pollen contre 40 millilitres de tampon Tris 5×10^{-3} pH 7,4 à la température de 4° durant une nuit. Le dialysat est recueilli et cette fraction sera désignée par C.

Préalablement aux essais biologiques, furent étudiées sur des parties aliquotes de ces différentes fractions A, B, C, les valeurs de la densité optique à 260 millimicrons, la teneur en protéines et en hydrates de carbone. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

<u>Fractions</u>	<u>% de D.O. totale à 260millimicrons</u>	<u>% de la teneur totales en protéines</u>	<u>% des sucres</u>
A	108 soit 49 %	90 %	95 %
B	109 soit 51 %	10 %	0
C	22 soit 12 %	50 %	33 %

Les essais biologiques effectués sur ces trois fractions révèlent que seules les fractions B et C sont actives et entraînent la pénétration des grains de résine. Ainsi, se trouvent confirmés les résultats précédents. Du fait, en particulier, que le dialysat d'extrait de pollen se soit révélé actif, il est permis d'affirmer que la protéine active est d'un poids moléculaire inférieur à 10.000. Signalons, à ce propos, l'expérience corrélatrice suivante :

- 50 milligrammes de pollen en suspension dans 10 millilitres d'eau distillée furent mis à dialyser durant 7 jours contre un litre d'eau distillée, renouvelée chaque jour.

Le pollen fut ensuite recueilli et instillé dans les narines des animaux sensibilisés.

Dans ces conditions, aucune pénétration intra-muqueuse ne fut constatée. La fraction antigénique active est donc bien d'un poids moléculaire tel qu'elle puisse être dialysée.

Afin d'analyser les fractions actives par chromatographie sur papier Whatman n° 1, la région distale du papier correspondant à la fraction n° 7 précédente fut découpée en trois zones de superficie égale, et éluées par l'eau distillée. L'essai biologique sur la muqueuse nasale a démontré que les trois fractions étaient actives, ce qui signifie que, par la méthode chromatographique sur papier, nous avons atteint la limite des fractionnements possibles.

Nous envisagerons ultérieurement les limitations expérimentales que connaît la méthode des résines échangeuses d'ions, vectrices de protéines antigéniques. Soulignons, simplement, à l'issue de cette première série d'expériences, combien le test offert par la pénétration intra-épithéliale s'est révélé constamment efficace et précis. Les résultats, par leur évidence, ne souffraient aucune discussion et ceci, répétons-le, en menant toutes les expériences en double insu.

Les résultats expérimentaux obtenus par la combinaison des méthodes biochimiques et immunologiques permettent d'affirmer qu'une protéine faiblement basique et ne contenant aucune fraction hydrocarbonée, d'un poids moléculaire inférieur à 10.000, est responsable de la pénétration d'une particule de masse relativement aussi importante que l'est une sphère de résine polystyrène calibrée à 23 microns de diamètre.

Ceci ne signifie pas forcément que cette fraction soit seule en cause lors de la pénétration d'un grain de pollen, mais il est certain qu'elle est une des fractions actives. Il peut paraître, en effet, *a priori* surprenant que parmi les nombreuses fractions protéïques et glycoprotéïques que renferme la substance pollinique et dont certaines sont de très haut poids moléculaire, ce soit une fraction relativement peu abondante et de poids moléculaire aussi faible qui puisse être responsable de la pénétration et donc, en définitive, de la cytotoxicité caractéristique de la réaction antigène-anticorps.

Cependant, certains résultats obtenus par les immunologistes américains qui se sont attachés à fractionner les protéines extraites du pollen de l'*Ambrosia artemisiae folia* (graminée de la famille des ambrosiacées - ragweed) qui est responsable d'un très grand nombre d'allergies aux Etats-Unis, peuvent dans une certaine mesure, être rapprochés de ceux que nous avons obtenus en étudiant le pollen de Bouleau. SIMON A.H. et RICHTNER M. (1957, 1958) ont mis en évidence une fraction antigénique active étudiée par les méthodes sérologiques classiques, qui, après quatorze jours de dialyse et après hydrolyse, fournit un résidu, encore actif, formé par le groupement de huit acides aminés seulement. Cette fraction est donc, par ces caractères physico-chimiques, assez voisine de celle que nous avons trouvée active par la combinaison des extractions biochimiques et des tests biologiques. On sait, d'ailleurs, que BECKER E.L. et MUNO J. (1949), CEBRA J J. (1957) ont isolé, par la méthode de diffusion sur gélose, au moins dix composés antigéniques différents dans le pollen de l'ambrosia, mais à aucun moment la preuve n'est apportée que ces antigènes, capables de provoquer l'apparition d'autant d'anticorps différents chez le Lapin, soient des facteurs antigéniques actifs au niveau de la muqueuse nasale des sujets souffrant d'allergie nasale par sensibilisation à l'ambrosia. C'est là un exemple de la nécessité de corroborer les résultats de telles études qui portent, essentiellement, sur les fractionnements biochimiques avec des tests biologiques précis permettant le contrôle de ces fractions non seulement sur le revêtement cutané mais sur le tissu, cible de tels allergènes.

COMPARAISON DES ALTERATIONS PROVOQUEES PAR LA RESINE ET LE POLLEN

L'étude histologique et cytologique des réactions provoquées par la présence de la résine vectrice d'antigène au sein de la muqueuse nasale peut être utilement effectuée en comparant ses résultats avec ceux que nous venons d'étudier et dont le pollen est responsable. Une telle étude est indispensable pour affirmer le caractère antigénique de la pénétration de la résine.

Nous avons étudié les résultats cytologiques de la pénétration de résines vectrices d'antigène pollinique entre quinze minutes et sept jours de contact au sein de la muqueuse. Si le fait de la pénétration unit pollen naturel et résine vectrice d'antigène, soulignons d'emblée que les altérations histologiques qui accompagnent la pénétration de la résine sont, de façon générale, moins intenses que celles qui caractérisent le contact, puis la pénétration du pollen.

Durant les premières minutes, certaines différences apparaissent nettement : c'est ainsi que la constitution d'une bulle d'oedème, clivant la couche des cellules ciliées, et qui constitue le témoin le plus précoce de l'intensité des destructions cellulaires après contact entre pollen et muqueuse nasale, n'a jamais été observée en cas d'utilisation de la résine comme vecteur d'antigène pollinique. Les aspects morphologiques qui traduisent les mécanismes de la pénétration sont quantitativement différents dans les deux cas. La résine commence par adhérer à la muqueuse et détruit simultanément les cils au niveau de son point d'impact ; les quelques cellules épithéliales sous-jacentes sont déprimées, puis secondairement détruites, mais il n'existe pas de lyse cellulaire diffuse et, à la différence de ce qu'on observe avec le pollen, aucune destruction en tache d'huile autour du point d'impact n'est constatée.

En résumé, le premier stade du contact résine-épithélium est caractérisé par une destruction très limitée et une adhérence de la résine aux cellules épithéliales. Cette adhérence est certainement très solide, car même s'il ne pénètre pas plus profondément, le grain de résine demeure en cette position sur les coupes, c'est-à-dire qu'il demeure fixé à la muqueuse en dépit des différentes manipulations techniques qu'exige l'obtention des coupes de microscopie optique. L'adhérence est probablement déterminée par les protéines antigéniques dont la résine est porteuse et qui précipitent au contact des anticorps cellulaires de surface. En observant non plus une dépression "en coup de poing" mais une véritable pénétration intra-muqueuse de la résine, on constate que cette pénétration s'effectue grâce à une lyse, très limitée, des cellules de la zone de l'impact.

Deux faits distinguent au niveau cytologique les désordres provoqués par la pénétration de la résine de ceux dont le pollen est responsable :

- alors que les cellules sont, à ce stade, maintenues à distance par l'importance des phénomènes cytotoxiques lorsque le pollen est en cause, dans le cas de la résine au contraire, l'adhérence cellulaire, si elle n'est pas totale, est néanmoins effective dès ce stade de lyse sur une partie importante de la périphérie.

- Par ailleurs, les réactions à distance (tel, en particulier, l'afflux des polynucléaires éosinophiles) ne sont pas aussi nettes lorsque la résine est vectrice d'antigène. Si l'on retrouve encore une notable proportion de polynucléaires, les formes éosinophiles ne sont plus en nombre aussi élevé. Ainsi peut-on résumer les différences comme étant de degré et non de nature. Il en résulte que si la réaction est aussi rapide (de l'ordre de quelques minutes), elle est cependant infiniment moins brutale, les phénomènes de lyse et de destruction cellulaire y sont estompés (photo 34).

L'ensemble explique que la résine s'enfonce, généralement, moins loin dans la muqueuse nasale sensibilisée que n'est susceptible de le faire le pollen. Ce qui prouve, indirectement, que l'importance du trajet parcouru au sein de la muqueuse est

fonction, à la fois de la masse de l'antigène en cause et de sa dilution progressive au contact des cellules sensibilisées. Le contact, durant trois jours, de la résine dans l'épaisseur de la muqueuse révèle des différences concernant les réactions cellulaires observées, dans le même laps de temps, au voisinage immédiat du grain de pollen. (Photo 35).

La résine est étroitement entourée par des cellules qui ne revêtent pas toutes l'aspect de macrophages, certaines appartiennent aux cellules épithéliales des couches profondes de la muqueuse. Par ailleurs, on ne note pas la présence de larges zones anhytes au voisinage de la résine, comme il en existe toujours en regard des pores du pollen. Cependant, à cette date, le choc anaphylactique n'est pas terminé ; en effet, nombreuses sont les cellules dans le voisinage immédiat de la résine qui offrent des zones de lyse vacuolaire au sein de leur cytoplasme, mais jamais ces réactions n'atteignent l'importance destructrice qui est de règle pour le pollen.

Après six et sept jours de contact, le grain de résine apparaît toujours étroitement enchâssé, mais ici encore si les polynucléaires sont relativement abondants, assez rares sont les cellules revêtant l'aspect de macrophages typiques. Il est fréquent de trouver dans le voisinage immédiat du grain de résine des cellules possédant un ergastoplasme dont les citernes apparaissent dilatées (photos 36 et 37). Deux faits distinguent nettement l'interaction résine-cellule :

- d'une part, les antigènes dont la résine est vectrice ne provoquent plus après 6 ou 7 jours de contact de phénomènes de lyse cellulaire notables ;

- d'autre part, la charge cytoplasmique en glycogène qui caractérise les réactions cellulaires autour du grain de pollen à ce stade n'existe pas ici.

Ce résultat négatif montre qu'il est difficile d'admettre que l'évidente abondance du glycogène n'est pas en rapport direct avec les mécanismes de l'assimilation par les cellules polynucléaires et macrophages de la substance du pollen.

L'ensemble des résultats précédents prouve que le type de résine que nous avons utilisé se comporte dans une large mesure comme un "pollen artificiel" et qu'il peut ainsi constituer un modèle expérimental nouveau ouvrant un certain nombre de voies de recherche concernant l'anaphylaxie nasale. Il devient, en particulier, possible à partir de pneumallergènes très complexes (pollen, nous l'avons vu, mais aussi poussière d'appartement, poils d'animaux) d'isoler des fractions très précises et de les tester, non plus seulement par précipitation en gel ou par hémagglutination en présence d'un sérum d'animal sensibilisé, mais aussi et surtout au niveau de la muqueuse nasale de ces mêmes animaux, muqueuse qui est le lien de pénétration de tous les pneumallergènes et qui constitue un ensemble tissulaire complexe ne fournissant pas obligatoirement des réponses semblables à celles que donne le revêtement cutané.

Cette voie de recherche que l'on peut mener jusqu'à l'identification chimique complète de la ou des fractions antigéniques actives, pourrait sans doute servir à tenter une désensibilisation locale par voie nasale, grâce à la fraction active mise en évidence par de telles études. Mais cet intérêt thérapeutique pour évident qu'il soit, n'entre pas dans le cadre de la présente étude.

En revanche, deux voies de recherche nous ont paru mériter d'être explorées :

- 1) examiner si la résine échangeuse d'ions possède une valeur générale en tant que vecteur inerte de protéines antigéniques, tout particulièrement lorsque l'antigène est de poids moléculaire plus élevé que celui isolé à partir du pollen ;
- 2) prouver que la méthode consistant à fixer des antigènes sur un vecteur inerte est de valeur générale susceptible de répondre à toutes les possibilités expérimentales que suggère la première utilisation d'un vecteur particulier (la résine) en ce domaine.

ESSAI NEGATIF DE GENERALISATION D'EMPLOI DE LA RESINE COMME "POLLEN ARTIFICIEL"

Nous avons bénéficié, au cours de ces deux études, de l'aide et de l'assistance technique du laboratoire de M. le Professeur PILLOT à l'Institut Pasteur.

L'immunoglobuline G

Nous avons utilisé comme antigène de l'immunoglobuline humaine G (I.G.G.). Il convenait, en effet, de disposer d'un antigène de haut poids moléculaire qui soit bien défini sur le plan biochimique et immunologique. L'I.G.G. possède un poids moléculaire de 150.000, sa constante de sédimentation 7 S et sa mobilité électrophorétique qui est celle des globulines gamma et alpha 2 sont parfaitement précisées sur le plan physico-chimique.

Pondéralement, c'est de beaucoup la plus abondante des globulines sériques, elle correspond à un poids de 12 à 15 milligrammes pour 100 millilitres de sérum (à titre comparatif la valeur des autres globulines se situe pour l'I.G.A. à 3,4 milligrammes, pour l'I.G.M. à 0,75 milligrammes, pour l'I.G.D à 0,4 milligrammes).

Chimiquement, elle est constituée par l'association de deux chaînes protéiques lourdes et de deux chaînes légères. Ces adjectifs qui définissent les chaînes, proviennent de leurs constantes de sédimentation différentes :

- les chaînes dites lourdes, appelées gamma dans le cas de l'I.G.G. (car la structure est similaire pour toutes les gammaglobulines) sont identiques et déterminent la classification immunologique de la globuline;
- les chaînes légères appartiennent à deux types, kappa et lambda; 66 % des molécules d'I.G.G. du sérum humain sont de type K (elles possèdent deux chaînes kappa), 34 % sont de type L (car elles possèdent deux chaînes

Ainsi, les anticorps anti-I.G.G. humaine, provoqués par l'injection et l'instillation d'une solution purifiée d'I.G.G., sont-ils spécifiques et parfaitement définis sur le plan immunologique.

En outre, les anticorps anti-I.G.G. permettent d'obtenir le phénomène d'anaphylaxie cutanée passive chez le cobaye. Les résultats immunologiques peuvent donc être comparés à ceux obtenus à l'aide des anticorps anti-pollen qui peuvent, également, provoquer (nous l'avons vu) l'anaphylaxie passive.

La méthode utilisée pour étudier la résine comme vecteur d'I.G.G. peut être résumée ainsi :

- 1) sensibilisation des animaux d'expérience (cobayes) par voie locale et générale ;
- 2) adsorption de l'I.G.G. par la résine ;
- 3) vérification, à l'aide des méthodes immunologiques classiques, de la présence d'anticorps sériques chez ces animaux ;
- 4) recherche par la méthode des fluorochromes suivant les techniques de SAINTÉ MARIE G. (1961), de COONS, LEDUC et KAPLAN (1951), de la présence d'antigène autour des sphères de résine et, éventuellement, au niveau des cellules périfocales de la muqueuse sensibilisée ;
- 5) étude cytologique en microscopie électronique de la résine vectrice d'I.G.G. et de son atmosphère cellulaire, comme nous l'avons fait pour la résine vectrice d'extrait de pollen.

Les chapitres 4 et 5 furent étudiés simultanément, leurs résultats se contrôlent mutuellement.

Les animaux (trois séries de huit cobayes) furent sensibilisés à l'I.G.G. humaine suivant la même technique de sensibilisations locale et générale que celle utilisée pour effectuer la sensibilisation à l'extrait de pollen.

- 4 injections intramusculaires de 2 milligrammes chacune;
- 6 instillations par voie nasale de 0,5 milligramme chacune (à peu près 3 milligrammes d'I.G.G. par cette voie).

Pour adsorber l'I.G.G. sur la résine, une solution de ces protéines fut préparée dans du tampon phosphate pH 7,4 à raison d'un milligramme par millilitre. La résine, préalablement lavée, fut alors mise en contact avec la solution précédente, à raison de 25 milligrammes de résine pour un millilitre.

La vérification de la teneur en anticorps des animaux sensibilisés fut opérée par hémagglutination passive à l'aide de globules rouges formolés, puis copulés avec l'I.G.G. par la glutaraldéhyde. Cette copulation fut effectuée en utilisant :

- 3 millilitres de G.R. à 10 %
- 3 millilitres d'I.G.G. à 0,58 milligramme par millilitre;
- 3 millilitres de glutaraldéhyde à 1 %.

Le contact est poursuivi quinze minutes à la température du laboratoire, les globules rouges sont ensuite lavés trois fois dans l'eau physiologique tamponnée, puis repris dans trois millilitres d'eau physiologique tamponnée, contenant 1 % d'albumine. Les hémagglutinations furent positives jusqu'à des dilutions de 1/600 à 1/3200 de sérum des animaux sensibilisés.

Etude en immunofluorescence de la muqueuse nasale

Cette étude nécessite la préparation de sérum anti-I.G.G. conjugué aux fluorochromes et nous avons, à cet effet, employé la fluorescéine et la rhodamine.

La technique utilisée dans le laboratoire du Professeur PILLOT à l'Institut Pasteur fut la suivante :

à une quantité donnée de sérum de lapin anti-I.G.G. humain, fut ajouté un demi-volume d'eau physiologique tamponnée deux précipitations successives furent effectuées par l'éthanol à 18 %. Le culot, repris dans un tampon phosphate 0,02 M de pH 7,3

est centrifugé pour éliminer la fraction insoluble, puis conjugué avec de l'isothiocyanate de fluorescéine dans la proportion d'un milligramme pour 70 milligrammes de protéines (cette valeur est critique et ne doit pas être dépassée). Le pH est ajusté à plusieurs reprises à pH 9. La solution fluorescente est agitée modérément durant douze heures à 4°.

Le conjugué est ensuite passé sur une colonne de chromatographie de cellulose DEA.E. (la colonne doit être constituée par environ 0,4 gramme de D.E.A.E. pour 30 milligrammes de protéines). Au préalable, la colonne est équilibrée par le tampon phosphate 0,02 M à froid et le conjugué dilué à moitié avec de l'eau distillée. Les éluions sont effectuées sur tampon phosphate aux différentes concentrations molaires suivantes : 0,01 M.; 0,02 M.; 0,05 M. Les liquides d'éluion sont dialysés durant trois jours à froid contre de l'eau physiologique tamponnée à pH 7,4 et concentrés ensuite par la méthode au carbowax.

Le conjugué ainsi obtenu est soumis à un double titrage :

- a) par la mesure spectrophotométrique de la densité optique, on obtient la teneur en protéines et en fluorescéine. C'est le rapport fluorescéine sur protéine ($\frac{F}{P}$) qu'il est important de déterminer pour la spécificité immunologique de la réaction. Ce rapport est optimum pour une valeur de 2 que l'on retrouve habituellement dans la fraction éluee à la concentration 0,02 M.
- b) On procède ensuite au titrage immunologique de la fraction retenue à la suite des mesures spectrophotométriques en utilisant le système tréponème-sérum humain syphilitique afin de préciser la dilution optima d'utilisation du conjugué. Ce dernier doit encore être utilisable à la concentration de 250 à 500 gammas de protéines par millilitre.

Pour utilisation sur coupes d'organes, il convient de

à la fois les éventuelles colorations non spécifiques

sont éliminées à deux reprises par épuisement sur poudre d'organe (foie de boeuf) à raison de 100 milligrammes de poudre d'organe pour vingt milligrammes de protéïnes, une heure tout d'abord, à la température du laboratoire avec la moitié de la quantité de poudre d'organe nécessaire, puis douze heures ensuite à + 4°, sous agitation modérée.

L'obtention des conjugués à la rhodamine que nous avons également utilisés obéit aux mêmes principes généraux. La solution destinée au marquage des protéïnes est composée de :

- . rhodamine 1 g.
- . pentachlorure de 2 g.
phosphore
- . acétone anhydre 10 ml.

La seule différence importante en ce dernier cas est constituée par le système immunologique de dosage, lequel est formé non pas par le système tréponème-sérum humain syphilitique, mais par le système salmonelles-sérum humain anti-salmonelles.

Recherches des antigènes au niveau de la muqueuse nasale des animaux sensibilisés.

Les animaux sensibilisés reçoivent, par la technique précédemment décrite et qui permet un repérage exact de la zone instillée, soit :

- environ 0,5 milligramme de poudre lyophilisée d'I.G.G. ;
- une suspension de résine seule ;
- une suspension de résine ayant été mise en contact avec la solution d'I.G.G. durant une heure comme précédemment indiqué ;
- une solution d'albumine bovine comme témoin, afin d'éliminer une éventuelle réaction non spécifique des protéïnes.

Du point de vue histologique, nous avons tout d'abord, utilisé la technique de SAINTÉ MARIE G. (1961). Cette méthode a, théoriquement, l'avantage de permettre la mise en évidence des localisations de la fluorescéine sur coupes, après une courte inclusion dans la paraffine. Cette méthode nous a constamment fourni des résultats négatifs. Elle ne nous a pas permis de mettre en évidence la présence de localisations des réactions antigène-anticorps au niveau de la muqueuse nasale des animaux d'expérience.

En raison de cet échec, nous avons ultérieurement effectué les coupes au cryostat en suivant la technique de COONS, LEDUC et KAPLAN (1951). Trente minutes après instillation des différentes formes d'antigène, les animaux sont sacrifiés et, en regard du repère osseux opératoire, des fragments du septum et du bord convexe du cornet inférieur sont prélevés. A ce niveau, la consistance des prélèvements permet, en effet, de les couper au cryostat, sans décalcification préalable. Après section, les coupes étudiées furent fixées une heure à 4° dans l'alcool éthylique à 90°, puis soumises à l'action des sérums anti-I.G.G. conjugués soit à l'isothiocyanate, soit à la rhodamine.

Il s'agit donc ici d'un système à trois composants : muqueuse sensibilisée, antigène et antisérum, système qui convient pour la localisation des antigènes.

Les résultats recueillis au niveau des différents prélèvements furent les suivants :

a) les muqueuses ayant reçu une instillation d'albumine bovine se révélèrent négatives, en ce sens qu'aucune fluorescence ne fut constatée ;

b) les muqueuses qui avaient reçu des instillations de résine seule révélèrent que cette dernière, comme nous le savions déjà, offre une auto-fluorescence importante à l'état normal. Il s'agit d'une fluorescence verte, uniformément répartie sur toute la surface de la sphère et ne diffusant évidemment pas dans le milieu ambiant. Cette dernière remarque s'adresse aux rares cas précédemment signalés où la résine s'accrole à la muqueuse ou même la déprime et s'invagine en elle (photo 39).

c) Les muqueuses qui reçoivent l'antigène sous forme de poudre d'I.G.G. déposée directement sur la muqueuse présentent un résultat positif sans ambiguïté. Celui-ci se traduit par l'apparition d'une fluorescence de couleur jaune vif qui apparaît soit sous forme de grains, soit sous forme de zones plus diffuses. (Photo 40). Deux faits sont à noter :

- l'I.G.G., malgré son poids moléculaire relativement élevé, pénètre la muqueuse et diffuse très largement en quelques minutes ;

- cette méthode, en nos conditions expérimentales, ne permet pas une étude histologique précise. D'une part, l'I.G.G. provoque, au niveau de la muqueuse sensibilisée, des altérations considérables du même caractère explosif que ceux précédemment signalés tout au long de cette étude. D'autre part, la fixation à l'alcool sur lame, après coupe au cryostat du tissu frais, n'est pas une technique qui permette l'obtention d'images histologiques de qualité. L'ensemble de ces difficultés se retrouve lorsqu'on étudie les muqueuses qui furent soumises à l'instillation de résine en contact préalablement avec l'I.G.G.

d) En ce dernier cas, en effet, les résultats que nous avons obtenus sont d'interprétation difficile. Les sphères de résine, outre leur fluorescence propre, sont entourées d'un mince liseré jaune-vert que l'on peut évidemment interpréter comme traduisant la présence d'I.G.G. Par ailleurs, l'étude histologique de la muqueuse, rendue difficile pour les raisons indiquées plus haut, ne révèle pas de localisations fluorescentes dans l'atmosphère cellulaire du voisinage. Il est d'ailleurs difficile de trouver des localisations où la résine soit en contact intime avec les cellules.

Les résultats précédents dont l'incertitude vient d'être soulignée furent confrontés à ceux fournis par l'étude en microscopie électronique de la résine préalablement mise en contact avec l'immunoglobine G dont elle est sensée devenir le vecteur.

Etude au microscope électronique des résines supposées vectrices d'I.G.G.

Afin de respecter les mêmes délais expérimentaux que ceux des expériences précédentes (au moins dans leur phase aiguë), nous avons étudié au microscope électronique la muqueuse des animaux sensibilisés à l'I.G.G. trente minutes et soixante minutes après instillation de cette résine.

Les résultats obtenus apparaissent différents de ceux observés lorsque le pollen (ou la résine vectrice de l'extrait de pollen) était en cause :

1) il est rare que ces résines pénètrent au sein de la muqueuse, nous n'avons rencontré que trois exemples sur plusieurs centaines de coupes examinées; outre la rareté de ce contact intime entre résine et cellules, qui contraste avec la très grande fréquence des pénétrations de cette même résine constatée lors de l'étude de la résine vectrice de l'extrait de pollen, il convient de souligner que l'afflux des polynucléaires éosinophiles qui se produit normalement moins d'une heure après l'instillation, n'a pas été observé ici;

2) enfin, même lorsqu'elles sont situées en contact avec des cellules épithéliales ciliées, ces résines ne provoquent pas de destruction cellulaire importante, en particulier elles n'entraînent pas la destruction brutale par fragmentation des structures ciliées comme il est de règle durant les premières minutes de déroulement du choc anaphylactique sur le plan cellulaire.

Cet aspect est proche de celui que nous avons précédemment signalé en ce qui concerne la pénétration (sans rupture de continuité de la muqueuse) des résines dans la muqueuse nasale non sensibilisée (photo 41).

Dosages biologiques de l'adsorption d'I.G.G. par la résine

Devant ces résultats, en particulier sur le plan cyto-
logique, nous avons (en collaboration avec le Laboratoire de
M. le Professeur PILLOT à l'Institut Pasteur) étudié *in vitro*
l'adsorption de l'immunoglobuline G sur la résine utilisée comme
vecteur d'antigène. Nous avons employé deux méthodes, l'une immu-
nologique, l'autre chimique.

La méthode immunologique est calquée sur la méthode
d'agglutination des particules de latex .

- 12 millilitres d'une suspension à 2 % de résine sont
mis en présence, durant 5 minutes, à la température
du laboratoire, avec 6 millilitres d'une solution
contenant :
 - a) dans une première série, un milligramme d'I.G.G.
humaine par millilitre ;
 - b) dans une seconde série, 5 milligrammes d'I.G.G.
par millilitre.

La solution dans les deux cas, est effectuée en tampon
glycocolle de pH 8,2.

- Lavage soigneux, à trois reprises, à l'aide de ce
même tampon
- Reprise en suspension dans de l'eau physiologique,
en concentrant quatre fois.

Le témoin est constitué dans chacune des séries par
une suspension de résine qui n'a pas été en contact avec la
globuline G (I.G.G.).

- Ces suspensions de résines sont mises en présence
de concentrations de sérum de chèvre anti-gamma-
globulines humaines décroissantes et, à titre de
contrôle, avec les mêmes concentrations de sérum de
chèvre normal.

Les résultats obtenus furent les suivants.

<u>Sérum anti-gamma</u> <u>humain</u>	<u>T</u>	<u>I.G.G.</u> 1mg./ml.	<u>I.G.G.</u> 5 mg./ml.
1/10	-	+	+
1/100	-	-	+
1/1000	-	-	-
1/10.000	-	-	-
1/100.000	-	-	-
<u>Sérum de chèvre</u> <u>normal</u>			
1/10	-	-	+
1/100	-	-	+
1/1000	-	-	-
1/10.000	-	-	-

Il apparaît que s'il existe une agglutination (uniquement, d'ailleurs, en présence des plus fortes concentrations de sérum), celle-ci n'est nullement spécifique, puisqu'on constate des valeurs analogues pour le sérum témoin.

Ces résultats furent confirmés par ceux résultant de l'étude chimique.

Cette dernière fut effectuée en utilisant la méthode de Folin, modifiée par LOWRY O.H. et coll. (1951) pour doser les protéines d'une suspension de résine préparée dans les mêmes conditions que précédemment.

Cette méthode est beaucoup plus sensible que celle de FOLIN, puisqu'elle permet de mettre en évidence une teneur en protéines de 10 gammas par millilitre, le témoin étant constitué par la résine seule.

Dans tous les cas, le résultat s'est révélé négatif, ce qui prouve l'absence, ou tout au moins une teneur de protéines inférieure à 10 gammas par millilitre.

Ainsi se trouve confirmé par ces résultats, obtenus *in vitro* par des méthodes différentes, le fait constaté *in vivo* que le type de résine que nous avons utilisé n'est pas vecteur de protéines antigéniques d'un poids moléculaire de 150.000.

Ce caractère négatif nous paraît offrir une preuve de la valeur immunologique des tests histologiques que constituent la destruction de la ciliature et la pénétration de l'antigène par rupture de la continuité de l'épithélium. Le contraste observé, lors de l'étude électromicroscopique, entre les résultats fournis par les résines vectrices d'antigène pollinique et ceux obtenus par les résines mises en contact avec l'I.G.G. qu'elles n'adsorbent pas (ou de façon insuffisante) confirme la valeur du "pollen artificiel" obtenu précédemment par l'extrait de pollen de bouleau.

Deux voies de recherche sont ouvertes dans ces conditions :

- a) les possibilités pour différents types de résines, calibrées de façon semblable à celle que nous utilisons, d'adsorber (en raison de leur structure chimique) des antigènes protéïques de haut poids moléculaire et, corrélativement, pour chacun de ces types de résines, le poids moléculaire maximum des protéïnes qu'elles sont susceptibles d'adsorber.

Ce problème n'est pas abordé dans le présent travail. Les antigènes qui sont susceptibles de provoquer l'anaphylaxie nasale sur le plan expérimental (ou l'allergie nasale sur le plan de la clinique humaine) sont très complexes. L'isolement de la (ou des) fractions actives pour chacun d'eux, et l'étude de chacune des fractions obtenues, après adsorption de cette dernière par un substrat neutre convenable dont elles provoquent la pénétration au sein de la muqueuse nasale, nécessiteront un long travail ultérieur.

- b) La possibilité de mettre au point d'autres types de "pollens artificiels" possédant des qualités physico-chimiques différentes de celles de la résine et susceptibles :
- de compléter sur le plan expérimental la gamme de tels "pollens";
 - de modifier la masse et les dimensions de ces vecteurs inertes;
 - de les adapter, enfin, aux diverses possibilités expérimentales qu'offriront des modèles à l'étude de l'anaphylaxie nasale.

Nous avons abordé l'étude de cette deuxième voie de recherche.

ETUDE D'UN AUTRE TYPE DE POLLEN ARTIFICIEL OU VECTEUR D'ANTIGENES

Le choix d'un vecteur inerte pour les antigènes de haut poids moléculaire s'imposait de lui-même. Il était naturel, en effet, de s'adresser aux *hématies formolées* qui constituent le substrat d'une des réactions immunologiques la plus utilisée : l'héماغglutination.

L'hématie formolée réunit les conditions requises pour constituer un "pollen artificiel" :

- elle peut être sensibilisée, ou plus exactement copulée avec des protéines de haut poids moléculaire, condition même de la réaction d'héماغglutination ;
- elle a perdu, du fait de sa fixation par le formol ou le glutaraldéhyde, la plus grande partie de sa spécificité antigénique propre et peut donc être considérée comme un vecteur inerte ;

- les liaisons covalentes qui s'établissent entre la membrane de l'hématie et la protéine antigénique sont très solides et, en ces conditions, le vecteur peut être soigneusement lavé avant instillation nasale (ce qui élimine le risque d'irritation non spécifique de la muqueuse) ;
- enfin, les dimensions des hématies sont telles qu'il est certain qu'elles ne peuvent normalement franchir la barrière membraneuse de la muqueuse (ainsi que nous l'avons vu précédemment, seules les particules d'un diamètre inférieur ou égal à trois microns peuvent franchir cette barrière).

Une difficulté expérimentale pouvait être soulevée *a priori* : celle qui consiste à reconnaître en toute certitude le globule rouge porteur d'antigène sur les coupes semi-fines destinées à être transférées du domaine de la microscopie optique à celui de la microscopie électronique.

Etant donné que nous sensibilisons toujours des mammifères, l'emploi d'hématies aviaires résolvait cette difficulté. Le fait que ces hématies soient nucléées, que leur forme soit ovale ou, plus exactement, naviculaire, devait permettre, en effet, de les reconnaître au microscope optique même lorsqu'elles sont entourées de globules rouges appartenant à l'animal d'expérience (cobaye).

Le choix de la molécule d'antigène s'imposait pour des raisons expérimentales analogues :

- elle devait être de haut poids moléculaire ;
- elle devait déterminer une sensibilisation mesurable par les tests sérologiques ;
- elle devait être mise facilement en évidence en microscopie électronique.

La ferritine nous a paru répondre à ces divers impératifs.

Isolée en 1937, sous forme cristallisée, par LAUFBERGER, il s'agit d'une molécule formée de deux constituants : une fraction protéique, ou apoferritine, associée à des micelles d'hydrophosphate de fer, ces dernières situées à l'intérieur de la molécule protéique sont visibles au microscope électronique (FARRANT J.L. 1954).

Le poids moléculaire de cette molécule est de 750.000, comportant 25 à 30 % de fer. Il s'agit donc d'une protéine de poids moléculaire sensiblement plus élevé que celui de l'I.G.G. Son diamètre est de 50 angströms (BESSIS M. et BRETON-GORIUS J., 1959). On conçoit que, dans ces conditions, SINGER (1959) ait proposé d'utiliser cette molécule comme antigène. Elle est identifiable au microscope électronique non seulement du fait de sa teneur en fer, mais en raison de sa morphologie très caractéristique. Il s'agit sur coupe fine d'un carré dont chaque angle est occupé par un point dense aux électrons.

Le marquage immunologique par la ferritine présente un double avantage : tout d'abord, sa précision cytologique, ensuite la possibilité offerte sur le plan moléculaire d'établir une étude quantitative de la réaction antigène-anticorps. La copulation des hématies aviaires fut effectuée sur des hématies de poule ou d'oie fraîchement prélevées.

1 millilitre d'hématies à 10 %,

1 millilitre d'une solution de ferritine à 5 mg./ml.,

1,25 millilitre de glutaraldéhyde à 2,5 %

furent mis en contact durant un quart d'heure à la température du laboratoire. Trois lavages furent effectués dans l'eau physiologique tamponnée à pH 7 et les globules rouges furent repris dans de l'eau physiologique tamponnée en concentrant de moitié le volume.

Il convient, dans un premier temps, avant toute expérience sur l'animal de laboratoire, de s'assurer de la présence de molécules de ferritine copulées sur la membrane des hématies ainsi traitées. Dans ce but, après centrifugation, le culot d'hématies est déshydraté, inclus dans la résine époxy et coupé à l'ultramicrotome. L'étude des coupes a été faite sans aucune coloration et sous un grossissement direct de 40.000 diamètres (120.000 de grandissement total) aux microscopes Siemens (Elmiskop 1) et Philips (M 200). Par un examen des photographies à la loupe, les molécules de ferritine ont été aisément identifiables grâce à leur aspect quadrangulaire. Elles sont accolées à la limite de la membrane de l'hématie, débordant parfois légèrement la limite de la coupe du globule rouge. Soulignons qu'en nos conditions expé-

rimentales, ces molécules ne se sont pas révélées très nombreuses ; nous ne les avons jamais trouvées accolées les unes aux autres. Certes, beaucoup, en raison de l'épaisseur relative de nos coupes, doivent échapper à une identification certaine. De l'examen de nos préparations, nous avons retiré l'impression que chaque plan de coupe total d'une hématie comptait une cinquantaine de molécules. Le comportement de ces globules rouges aviaires en présence d'une muqueuse sensibilisée n'en revêt que plus de valeur, la faible densité de l'antigène permet une analyse plus précise des lésions déterminées par une molécule isolée. (photo 42).

Etude au microscope électronique

Le choc anaphylactique déterminé par ces hématies aviaires, vectrices de ferritine, sur les muqueuses sensibilisées fut étudié après dix, vingt, quarante-cinq minutes, deux heures et vingt-quatre heures de contact.

Indiquons, avant d'entrer dans le détail de la séquence des altérations cellulaires que provoque ce type de "pollen artificiel" qu'elle est entièrement comparable à celle que nous avons précédemment étudiée lors de l'utilisation du pollen de bouleau comme antigène.

On y retrouve, en fonction du temps de contact, les aspects caractéristiques du choc anaphylactique :

- la destruction immédiate des cils vibratiles ;
- la pénétration du vecteur d'antigène au sein des cellules épithéliales en voie de lyse périfocale ;
- l'afflux des polynucléaires éosinophiles ;
- l'activité, enfin, des cellules macrophages.

La séquence de ces interactions entre l'antigène et les cellules ne fut pas étudiée au-delà de la vingt-quatrième heure, ce délai s'avère suffisant pour permettre une comparaison valable entre les observations faites en utilisant le pollen comme antigène et celles concernant le "pollen artificiel" constitué par les hématies vectrices de ferritine.

Dans le détail, on constate que les globules rouges, vecteurs de ferritine, dix minutes après leur instillation, sont parvenus au voisinage immédiat des structures ciliées et que ces dernières sont, non seulement immobilisées, mais en voie de destruction totale.

Il en résulte :

- 1) que, compte tenu du temps nécessaire à l'arrêt total du mouvement ciliaire, la destruction commence de trois à six minutes après l'établissement du contact entre les cils et l'hématie vectrice d'antigène. Or nous avons toujours noté qu'une hématie normale est balayée avec une extrême rapidité par le mouvement ciliaire normal (photo 43) ;
- 2) qu'il ne peut s'agir ici, comme nous l'avions supposé en étudiant le pollen, d'une fraction antigénique extrêmement soluble susceptible en quelques minutes de paralyser puis de détruire les cils et de favoriser ainsi le contact de l'antigène avec les structures ciliées et les cellules épithéliales rapidement détruites ; il ne peut exister d'antigène diffusible puisque la ferritine est fixée par des liaisons chimiques aux protéines de la membrane du globule rouge (photo 44) ;
- 3) pourtant, l'étude au microscope électronique des coupes obtenues au niveau des muqueuses sensibilisées à la ferritine permet de constater que, vingt minutes après instillation nasale, non seulement des globules rouges aviaires sont au contact de la muqueuse (ce qui suppose l'arrêt du mouvement ciliaire) mais encore qu'un certain nombre de molécules de ferritine, fixées à la surface de l'hématie copulée, sont détachées de cette dernière et qu'elles ont été en mesure de franchir les membranes cellulaires (photo 45).

La preuve de tels faits est constituée indirectement par la constatation d'un afflux de polynucléaires éosinophiles, afflux à la fois précoce et localisé

au voisinage immédiat des hématies aviaires sensibilisées. En outre, une preuve directe est fournie par la mise en évidence de molécules de ferritine dans des zones de lyse vacuolaire situées au niveau du cytoplasme de polynucléaires éosinophiles en voie de destruction. Ces molécules de ferritine sont localisées en bordure de vacuoles intracytoplasmiques voisine de granulations éosinophiles.

En outre, dans un laps de temps analogue (de 20 à 45 minutes) après instillation, nous avons également mis en évidence des molécules de ferritine au niveau de structures ciliées en voie de destruction (Photos 46 et 47). Ainsi s'affirme le fait qu'entre la dixième minute et la quarante-cinquième minute après l'instillation nasale, un certain nombre de molécules de ferritine sont arrachées de la membrane du vecteur neutre, pour être engagées dans une réaction antigène-anticorps, non seulement au niveau des surfaces cellulaires, mais aussi après pénétration des membranes au sein du cytoplasme de cellules ou de structures ciliées sensibilisées, qui sont détruites par cette réaction.

De tels résultats expérimentaux supposent un mécanisme différent de celui qui préside *in situ* à la classique réaction d'hémagglutination au cours de laquelle l'agglutination immunologique demeure parfaitement stable dans des laps de temps comparables.

Les localisations des molécules de ferritine constatées au microscope électronique conduisent à envisager que les anticorps de surface, situés au niveau du mucus et de la surface libre des cellules épithéliales de la muqueuse sensibilisée sont susceptibles, en quelques minutes, de libérer un certain nombre (mais non la totalité, nous le verrons) des antigènes fixés sur un vecteur neutre.

Jusqu'à la vingt-quatrième heure de contact, la séquence des évènements est entièrement comparable (mais de façon plus explicite encore) à celle que nous avons constatée lorsque le pollen était en cause : c'est ainsi que deux heures après l'instillation, des molécules de ferritine sont mises en évidence au niveau du cytoplasme de cellules ciliées en voie de lyse vacuolaire (photo 48). La localisation des molécules d'antigène ne se fait d'ailleurs pas au hasard, on les trouve de façon constante dans les zones de condensation cytoplasmique situées en bordure de ces zones de lyse vacuolaire.

De façon analogue au grain de pollen, le globule rouge aviaire, qui constitue le vecteur de l'antigène, pénètre dans la muqueuse, s'y constitue une logette témoignant de la destruction péri-focale provoquée, comme nous venons de le voir, par les molécules de ferritine et provoque ensuite l'afflux de cellules macrophages. Les globules rouges, vecteurs de l'antigène, peuvent être, en raison de leur taille, entièrement phagocytés par une seule cellule (photo 49), ce qui est, évidemment impossible lorsque le pollen ou la résine sont en cause. Le résultat sur le plan cellulaire est néanmoins le même, c'est-à-dire, la disparition rapide de la cellule macrophage qui est rapidement lysée.

Il n'en demeure pas moins que si ce mécanisme peut expliquer la capture relativement tardive d'une certaine proportion de molécules de ferritine (photo 50), il ne peut rendre compte de la diffusion extrêmement rapide que nous avons constatée dans les trente premières minutes de la réaction anaphylactique, période durant laquelle, aucune cellule macrophage n'entre encore en contact avec les hématies vectrices d'antigène.

Valeur de ce modèle expérimental

L'utilisation de ces hématies offre la possibilité d'étudier des antigènes de très haut poids moléculaire. A la différence des charges électriques qui sont en cause lorsqu'on utilise la résine comme "pollen artificiel", il s'agit ici de liaisons chimiques de covalence et il est remarquable de constater qu'elles sont soumises aux mêmes séquences immunologiques que les précédentes.

Ainsi, deux modèles de "pollen artificiel" de valeur physico-chimique différente sont offerts à l'étude expérimentale de l'anaphylaxie nasale.

Les possibilités expérimentales que présentent ces modèles sont multiples.

Ils permettent de fixer sur les substrats inertes qui en constituent la masse des antigènes très variés. Il est possible de repérer certains de ces antigènes en microscopie optique et de les étudier ensuite grâce à la microscopie électronique. L'utilisation du marquage des antigènes, soit par la ferritine, soit par des enzymes pouvant être mises en évidence par les techniques de microscopie optique et de microscopie électronique, est dès lors réalisable.

Ces modèles permettent également d'introduire au sein de la muqueuse nasale, et ceci durant un très long laps de temps, une quantité connue d'antigène et d'en mesurer les effets du niveau cellulaire. En outre, une des cavités nasales de l'animal peut être utilisée comme une véritable chambre de culture et les modifications constatées sur le plan cellulaire sont ainsi susceptibles d'être comparées à celles fournies par les techniques de culture cellulaire *in vitro*. De plus, la cavité nasale du côté opposé peut servir de témoin chez le même animal, ce qui est impossible lorsqu'on utilise un antigène liquidien car, en ce dernier cas, un reflux du liquide par la voie des choanes est toujours possible et, par ailleurs, un certain nombre d'animaux de laboratoire (rat) offrent une déhiscence du septum à l'état normal.

Enfin, ces modèles permettront de mesurer les variations locales de la teneur en immunoglobulines de la muqueuse nasale, sous l'influence de la localisation à un niveau histologique précis de la réaction antigène-anticorps. Nous verrons que la muqueuse nasale à l'état normal contient sinon uniquement, du moins en grande majorité, des immunoglobulines A, les immunoglobulines G apparaissent et se développent dans les cas (d'ailleurs fréquents) où la muqueuse est le siège d'une inflammation, en particulier microbienne (BRANDTZAEG P. et coll. 1967).

Mais jusqu'à présent aucune modification expérimentale, tant qualitative que quantitative, de ces différentes immunoglobulines n'a pu être mise en évidence. Cela tient au fait que les recherches ont essentiellement porté sur la muqueuse nasale de l'homme par défaut de modèles expérimentaux applicables à la muqueuse des animaux de laboratoire.

En permettant d'étudier les séquences des événements antigéniques de façon aussi proche que possible de ce qu'elle est dans la réalité pathologique, séquences dont la première se déroule depuis le contact de l'antigène avec la muqueuse jusqu'aux transformations de ce même antigène provoquées par l'action des polynucléaires et des macrophages, ces modèles expérimentaux donnent la possibilité d'aborder deux problèmes d'intérêt très général à propos desquels nos connaissances sont encore embryonnaires :

- a) le problème de "l'autonomie immunologique" de la muqueuse nasale (ou plus généralement des voies aériennes supérieures) ;
- b) le problème du mécanisme de la destruction cellulaire provoquée localement, de façon explosive, par le contact antigène-anticorps.

L'AUTONOMIE IMMUNOLOGIQUE DE LA MUQUEUSE NASALE

C'est là une notion qui, sans être clairement définie, trouve sa justification dans les résultats récents obtenus lors d'essais de vaccination par voie nasale. Nous avons précédemment cité les pionniers dans ce domaine (cf. p.9). Depuis ces premiers essais, cette voie de recherche immunopharmacologique n'a jamais été abandonnée. La vaccination anti-grippale a, en particulier, suscité des travaux importants depuis que FRANCIS T. (1943) a proposé, pour la première fois, cette voie d'administration pour une telle vaccination. Les études de FAZEKAS de St.GROTH S.(1950) ont confirmé la possibilité de provoquer l'immunité locale, enfin, les études de SMORODINTSEV A.A. et CHALKINA O.M. (1955) ont déterminé l'U.R.S.S. a appliquer ce type de vaccination à de larges couches de la population. Or, les auteurs précédents avaient déjà noté qu'il n'existait pas un parallélisme rigoureux entre la résistance à l'infection virale et le taux des anticorps circulants.

Récemment, OGRA P.L. et KARZON D.F. (1969), étudiant les réponses immunologiques de sujets auxquels fut administrée, par voie nasale, une dose de vaccin poliomyélitique inactivé, ont constaté les faits suivants :

Cinq à six jours après l'inoculation par voie nasale de la première dose de vaccin, des anticorps apparaissent au niveau des sécrétions nasales sous forme d'immunoglobulines A. Le taux en demeure élevé jusqu'au trentième jour, pour diminuer ensuite lentement et finir par disparaître aux environs du centième jour. Fait capital, ces immunoglobulines A apparaissent localement, même si parallèlement la teneur en I.G.A. du sérum n'augmente pas. Les anticorps retrouvés uniquement dans la sécrétion d'une muqueuse peuvent donc demeurer localement à un taux élevé durant un laps de temps assez long et assurer à l'individu un degré de protection non négligeable sans que ses anticorps circulants augmentent parallèlement.

L'autonomie des réactions immunologiques de la muqueuse nasale s'affirme également par le caractère particulier des anticorps formés à son niveau. Il s'agit, en effet, de gamma immunoglobulines A. D'après les résultats obtenus par TOMASI T.B. et coll. (1965), confirmés par ceux de SMITH C.B. et coll. (1967), de MARTINEZ-TELLO F.J. (1968), il s'agit d'un type particulier d'immunoglobulines A, de coefficient de sédimentation 11 S et qui possède un poids moléculaire de 390.000.

Ces immunoglobulines sont constituées, comme les autres, par des chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfurés, mais à la différence des I.G.A. du sérum dont le coefficient de sédimentation est 7 S et le poids moléculaire de 170.000, les I.G.A. mises en évidence par lavages du rhinopharynx ne présentent pas d'altération décelable de leurs constantes physicochimiques lorsqu'elles sont soumises à une réduction de leurs ponts disulfurés.

Ces caractéristiques ne sont pas particulières aux anticorps du mucus nasal, elles appartiennent également aux anticorps de la salive. Par contre, comme l'ont montré les travaux d'ALLANSMITH M. et coll. (1965), les immunoglobulines trouvées au niveau de la peau, essentiellement au niveau de la partie supérieure du derme, sont du type I.G.G., comme d'ailleurs la masse la plus importante des immunoglobulines circulantes.

Sur le plan cellulaire, les localisations de ces immunoglobulines A ont été étudiées par immunofluorescence et autoradiographie. Les résultats obtenus sont à la fois fragmentaires et assez imprécis. D'après BRANDTZAEG P. et coll. (1967), on trouve dans la muqueuse nasale les globulines essentiellement au niveau des *acini* des glandes séromuqueuses et des cellules bordantes du segment profond des canaux excréteurs. En outre, des plasmocytes sont mis en évidence par immunofluorescence dans le voisinage immédiat des *acini*. Nos résultats expérimentaux tendent, également, à confirmer l'autonomie immunologique de la muqueuse nasale. Ils démontrent, en effet, qu'au niveau du chorion et de la couche profonde de la muqueuse existent des cellules libres, en nombre suffisant pour répondre aux agressions immunitaires. Elles constituent une véritable couche cellulaire qui, pour être discontinue, n'en mérite pas moins d'être individualisée au même titre que le chorion, par exemple.

La présence d'un antigène particulière provoque l'afflux de ces cellules et sa phagocytose progressive. La séquence des évènements cellulaires, qui se succèdent durant au moins trente jours autour du grain de pollen enchâssé dans la muqueuse (période durant laquelle il se vide lentement de sa substance), démontre que ces cellules sont capables de métaboliser *in situ* les antigènes.

Les polynucléaires, au voisinage immédiat de l'antigène, sont considérés comme capables de dégrader les protéines antigéniques, au point de leur faire perdre leur spécificité. Les macrophages qui, on l'a vu, entourent complètement le grain ou les "pollens artificiels" se renouvellent au fur et à mesure de leur lyse, provoquée par l'importance de la masse antigénique à laquelle ils sont confrontés. Ces dernières cellules sont, au contraire, susceptibles de dégrader les molécules protéiques en conservant le motif antigénique. Quant à l'apparition tardive de cellules de valeur plasmocytaire à ce niveau, elle revêt une signification particulièrement importante, car elle définit l'entrée dans la deuxième séquence des évènements immunologiques, celle qui, des anticorps phagocytés, va aboutir à l'élaboration des immunoglobulines. La présence d'une quantité suffisante de cellules immuno-compétentes au niveau de la muqueuse nasale explique les différences quantitatives observées dans les taux d'héماغglutination trouvés au niveau du sérum (où les agglutinines font fréquemment défaut) et dans le liquide de lavage naso-pharyngé où ces taux peuvent être élevés.

Les mêmes différences, au moins sur le plan qualitatif cette fois, furent constatées au cours de notre étude. Le sérum des animaux sensibilisés par voie nasale ne contenait pas d'agglutinine et ne provoquait pas (ou exceptionnellement) l'apparition de précipitation par la méthode de diffusion en gel de OUDIN. Par contre, les réactions locales sur le plan cellulaire, en particulier la destruction des structures ciliées (qui nous paraît le test cytologique le moins discutable) ont toujours été retrouvées par l'examen microscopique de la muqueuse. Donc, ici, comme dans le cas, des recherches récentes précédemment analysées, il n'existait aucun parallélisme entre la teneur en anticorps circulants et celle en

en anticorps cellulaires de la muqueuse nasale.

Le rapprochement des résultats expérimentaux précédents fait apparaître qu'il existe, au niveau de la muqueuse nasale, un système immunologique caractérisé par la production locale d'un type particulier d'anticorps, qui doivent être nettement distingués des anticorps circulants. Que ces anticorps locaux soient, au moins pour une part, des anticorps de surface est démontré par certains de nos résultats expérimentaux. La destruction immédiate, par un phénomène de lyse, du cil vibratile au contact de l'antigène suppose la présence d'anticorps de surface, de même que le prouve l'observation en chambre de culture de la précipitation du contenu pollinique au contact des muqueuses sensibilisées, et seulement au contact de celles-ci.

Ainsi sont posés deux nouveaux problèmes :

- 1) celui du transport des anticorps depuis les cellules plasmocytaires (ou lymphoplasmocytaires) du chorion jusqu'au niveau du mucus nasal ;
- 2) celui du mécanisme de la destruction cellulaire qui résulte de la réaction antigène-anticorps

Ces deux problèmes demeurent, actuellement, sans réponse.

Le problème du transport des anticorps élaborés *in situ* n'a jamais, au moins à notre connaissance, été étudié de façon précise. Il s'agit pourtant là d'un système de transfert de l'information assez bien limité dans l'espace et le temps. En effet, tout ce que l'on sait de la physiologie nasale indique clairement qu'un tel transfert doit être localisé au niveau des *acini* des glandes séro-muqueuses du chorion. Deux types de glandes, nous l'avons vu, assurent l'homoéostasie des constituants physico-chimiques du mucus nasal : les glandes caliciformes superficielles, dont la sécrétion muqueuse débouche directement à la surface de la muqueuse, et les glandes séro-muqueuses plus profondément situées

au niveau du chorion. Ce sont les seules qui, normalement, sont entourées d'une couche plus ou moins dense de cellules libres parmi lesquelles on retrouve après sensibilisation des plasmocytes. Ce dernier type de cellules est très rarement constaté à l'état normal. C'est par les structures sécrétoires séromuqueuses que doit être effectué le transfert jusqu'au mucus des immunoglobulines qui sont présentes en ce milieu et au niveau de la surface ciliée de l'épithélium.

MECANISME DE LA DESTRUCTION CELLULAIRE

Le dernier problème que nous aborderons dans le présent travail est celui qui concerne les mécanismes qui président à la destruction quasi-immédiate des cellules lorsque s'élabore à leur contact le complexe antigène-anticorps. Cette lyse vacuolaire est à la fois extrêmement rapide et d'observation absolument constante dans nos conditions expérimentales. C'est ce phénomène, en particulier, qui conditionne la pénétration du pollen dans l'épaisseur de la muqueuse nasale.

En ce domaine de l'immunocytolyse, nos connaissances actuelles concernent essentiellement le rôle du complément dans la destruction des membranes (particulièrement la membrane des hématies). Une importante revue générale récente de MULLER-EBERHARD H.J. (1969) fait le point de ce problème très complexe.

Le Complément

Le complément est défini, tout d'abord, par sa constitution chimique. Il s'agit d'une globuline dont on connaît actuellement onze fractions de valeur enzymatique différente. Il représente à peu près 10 % du total des globulines sériques chez l'homme.

Mais il est défini, également, par un ensemble de réactions biologiques ; parmi les plus importantes, il convient d'indiquer que certaines de ces fractions immunologiquement activées sont responsables de la libération de l'histamine par les mastocytes, de la contraction des muscles lisses, des altérations de la perméabilité capillaire, du chémotactisme des leucocytes polynucléaires et de l'accroissement du pouvoir phagocytaire.

Mais l'activité qui nous intéresse essentiellement ici concerne le rôle capital que joue le complément dans les altérations des membranes cellulaires : facteur initial de l'immunocyto-lyse. Cette lyse se produit, généralement (mais pas nécessairement) en présence du complexe antigène-anticorps. L'ensemble des réactions qui aboutissent à cette destruction cellulaire constitue un exemple remarquable d'une séquence chronologique d'activités biologiques déterminées par une succession d'interactions protéiques.

Le mécanisme de destruction de la membrane débute par la présence d'un anticorps de surface qui se combine à l'antigène. Il semble bien que seules les globulines du type Gamma M ou Gamma G possèdent un site accepteur de la combinaison avec le fragment C 1 du complément (qui est actif par une de ses trois fractions C 1 Q). Cette combinaison entraîne la conversion de pro-enzyme C 1 en C 1 estérase. Le complexe formé est réversible, les molécules libres et engagées dans la réaction sont en équilibre dans le milieu. Le complexe catalyse la liaison des fractions C 2 C 4 sur la surface membranaire et détermine la formation d'une C 3 convertase fixée à la membrane.

Ces liaisons, et c'est une loi générale de l'activité du complément, entraînent la formation, à partir des fragments C 2 et C 4, d'un clivage enzymatique qui divise chacun d'eux en fractions de poids moléculaires inégaux dont une seule est active. Les deux fractions C 2a et C 4b sont activées et forment en présence de calcium et de magnésium un complexe actif C 4b-C 2a. A ce stade, et c'est fort important, le rôle de la fraction active de C 1 se termine. La fraction C 4b - C 2a active le fragment C 3 dont la fraction active C 3a possède en propre des activités de type anaphylactique et chémotactique.

Le mode d'action des fragments C 5, C 6, C 7 est mal connu, car leurs groupements actifs sont extrêmement labiles. Par contre, on sait que la fraction C 8, activée par le complexe précédent, se fixe sur les parois membranaires dont elle détermine la destruction par une lyse de durée très longue.

La fraction C 9, par activation de C 8, rend ce phénomène de destruction beaucoup plus rapide.

Pour résumer nos connaissances actuelles sur ce phénomène (l'un des plus complexes de l'immunologie), on peut diviser schématiquement les constituants du complément en deux systèmes enzymatiques :

- le système C 1, C 2, C 3 et C 4 constitue une première séquence d'activation,
- le système C 5, C 6, C 7, C 8, C 9 constitue le véritable mécanisme d'attaque et de lyse cellulaire.

On connaît un certain nombre d'inhibiteurs qui agissent à différents stades de cet enchaînement d'activations protéiques qui s'effectue toujours dans un ordre rigoureux.

Le plus important de ces inhibiteurs (au moins en ce qui concerne la présente étude) est constitué par le sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique (E.D.T.A.) P.M. 374. En raison de sa propriété de chélation des métaux, en particulier du calcium, ce corps bloque, en effet, l'activité du complément au niveau de son premier fragment C 1. Il est ainsi capable d'entraver le déroulement ultérieur de l'activité enzymatique. Son activité inhibitrice se manifeste jusqu'à la dilution de 0,09 M (FRANK M.M. et coll. 1964).

Afin d'étudier sur le modèle expérimental, constitué par la muqueuse nasale d'animaux sensibilisés mise au contact de l'antigène, le rôle éventuel que joue le complément dans l'arrêt du mouvement ciliaire et la destruction des structures ciliées, nous avons effectué sur le cobaye (animal dont on sait que le sérum possède normalement le complément) les expériences suivantes.

Action de l'E.D.T.A. sur la muqueuse nasale

Etude de l'action, sur le mouvement ciliaire, de différentes solutions d'acide éthylène diamine tétracétique, de poids moléculaire croissant (sur l'animal normal, non sensibilisé). Il convient, en effet, de souligner que si l'inhibition du complément a été déterminée *in vitro* par une dilution de 0,09 M, il n'est pas légitime de transposer ce résultat lorsqu'on étudie le même phénomène dans un autre système expérimental *in vivo*.

Nous avons étudié l'action, sur le mouvement ciliaire de l'animal normal, des trois solutions suivantes, de poids moléculaire progressivement croissant : 0,10 M, 0,20 M et 0,30 M - les solutions étant amenées à pH 7,4 par la soude M/10. Leur osmolarité varie de 450 milliosmoles à 900 milliosmoles.

La muqueuse nasale du septum de l'animal sacrifié fut disséquée et examinée en cellule de Malassez, sous un grossissement de 200 diamètres, moins de cinq minutes après la mort de l'animal. Dans ces conditions, le mouvement ciliaire est parfaitement visible et persiste lorsque le fragment est immergé dans du sérum physiologique durant plusieurs heures, à condition que l'on prenne la précaution d'éviter la concentration par évaporation du milieu d'observation. Nous avons pu vérifier sur six animaux normaux que les mouvements ciliaires persistent durant une heure, sans modification, lorsque la muqueuse est immergée dans les différentes solutions, de concentration croissante, d'E.D.T.A. Notons, à ce propos, que la concentration de 0,30 M d'E.D.T.A. est très voisine du point de saturation (12 %), compte tenu des conditions de pH qu'il est indispensable de respecter.

Ce laps de temps d'une heure auquel nous nous sommes limités est suffisant, car nos constatations expérimentales, on l'a vu précédemment, fixent à un maximum de dix à vingt minutes le délai nécessaire à la destruction des cils vibratiles du fait de la constitution du complexe antigène-anticorps. En revanche, la cinétique de la chélation du calcium soluble par l'E.D.T.A. doit être étudiée.

Nous avons précédemment (CHEVANCE L.G. 1963) étudié comparativement la cinétique de la décalcification des structures

osseuses de la capsule optique et des osselets à l'aide des solutions acides, d'une part, et de l'acide éthylène diamine tétracétique (sel disodique), d'autre part. Cette étude a démontré que 25 % du calcium lié aux structures protéiques constitutives de l'os est chélaté durant les six premières heures ; ce qui représente en poids environ 1,5 milligramme de calcium. Mais il s'agit là de calcium étroitement lié aux structures collagènes, qui sont particulièrement denses au niveau des os de la capsule optique. Il est évident qu'on ne peut extrapoler ces résultats de l'os à la muqueuse nasale. Le calcium situé au niveau de la muqueuse existe sous forme soluble et la cinétique de telles réactions est, entre autres facteurs, fonction des liaisons physico-chimiques dans lesquelles le calcium est engagé.

Afin de mettre en évidence la cinétique de la réaction de chélation au niveau de la muqueuse nasale, nous avons utilisé la technique de coloration histochimique au glyoxal-bis (2-hydroxyanil) de KASHIWA H.K. (1966). Cette technique, qui est spécifique pour la mise en évidence du calcium sous forme ionisée, est parfaitement adaptée à la solution de notre problème. Le calcium soluble est, en effet, la seule fraction calcique qui soit susceptible d'agir comme activateur du fragment C 1 du complément. Nous avons utilisé la technique sur tissu frais, non fixé (modalité dont les possibilités sont soulignées par l'auteur). La muqueuse, immédiatement après son prélèvement, est étalée sur une lame porte-objet et quelques gouttes de la solution alcoolique de glyoxal sont instillées à son contact. Le développement de la coloration rouge vif caractéristique est, en ces conditions, beaucoup plus rapide que l'auteur l'indique. En effet, il suffit d'une dizaine de minutes pour qu'elle apparaisse et vingt à trente minutes pour qu'elle atteigne son maximum. La préparation peut être contre-colorée par une solution alcoolique à 0,2 % de bleu de méthylène, mais il est souvent difficile d'équilibrer les deux colorations, le bleu de méthylène ayant tendance à colorer trop fortement l'ensemble de la préparation du fait de son épaisseur relative.

Les résultats positifs obtenus révèlent les faits suivants (observés, rappelons-le, sur muqueuse fraîche) : les localisations calciques s'observent, essentiellement, au niveau des glandes de la muqueuse, les autres localisations sont mises en évidence au niveau du chorion (riche en tissu collagène) et dans les vaisseaux de la sous-muqueuse (calcium du plasma). Cependant, le résultat le plus important, pour la suite du déroulement de l'expérience de blocage de la fraction C 1 du complément tient dans le fait qu'après vingt minutes de contact entre la muqueuse et une solution de complexon (0,2 M ou 0,3 M), la réaction au glyoxal devient entièrement négative au niveau du fragment de muqueuse ainsi traitée. La sensibilité de la réaction se situe dans l'échelle des gammas de calcium soluble. Constatant la disparition complète de la coloration après traitement par l'E.D.T.A., il devenait donc légitime de poursuivre l'essai de blocage de l'activité de la fraction C 1 du complément au niveau de la muqueuse nasale.

Etude expérimentale sur l'animal sensibilisé

Dans ce but, nous avons étudié le comportement du mouvement ciliaire chez six animaux sensibilisés (cobayes) :

- trois sont sensibilisés à l'immunoglobuline G humaine,
- trois sont sensibilisés au pollen de bouleau.

Toutes ces sensibilisations sont effectuées, à la fois, par voie générale et locale, suivant la technique précédemment décrite.

Les animaux sont ensuite sacrifiés et la muqueuse recouvrant chaque face du septum est immédiatement disséquée et divisée en trois prélèvements A, B et C (de dimensions à peu près égales), soit six prélèvements pour chaque animal. Ces prélèvements sont placés en cellule de Malassez et chacun d'eux est observé au microscope en contraste de phase (oculaire 12,5 - objectif 20 X 1,5) dans l'ordre chronologique et dans les conditions suivantes :

- le prélèvement A est mis en contact d'eau physiologique et immédiatement examiné afin de s'assurer (au moins de façon globale) que le battement ciliaire est normal ;

- le prélèvement B est placé au contact de l'extrait antigénique et examiné cinq à six minutes après le début de ce contact ;

- le prélèvement C est immergé dans une solution d'E.D.T.A. (0,3 M - pH 7,2) dont l'osmolarité est de 455 milliosmoles) et examiné après vingt minutes de contact.

(Ce laps de temps est mis à profit pour s'assurer que le battement ciliaire persiste de façon normale au niveau du fragment A et que ce même battement s'est arrêté au niveau du fragment B mis en contact avec l'antigène).

Le prélèvement C est alors rapidement lavé dans une solution d'eau physiologique, préparée à l'aide d'eau permutée afin de ne pas renfermer de calcium, et mis au contact de l'antigène.

Différents antigènes ont été utilisés :

- a) extrait de pollen en eau physiologique (10 milligrammes de pollen sec par millilitre),
- b) solution en sérum physiologique d'I.G.G., à la dose également de dix milligrammes par millilitre,
- c) grains de pollen desséché, projetés directement sur la muqueuse en cours d'observation microscopique,
- d) poudre d'immunoglobuline G lyophilisée, projetée dans les mêmes conditions, sur la préparation.

Dans ces deux derniers cas, la préparation est ensuite recouverte d'une lamelle, afin de faciliter la poursuite de l'observation.

Dans tous les cas, les résultats observés sont comparables pour les fragments B et C (rappelons que la comparaison est d'autant plus valable - concernant des animaux immunisés - qu'il s'agit ici de fragments qui proviennent de la muqueuse nasale du même animal).

L'arrêt du mouvement ciliaire fut observé de dix à quinze minutes après le contact entre l'antigène et les cellules ciliées de la muqueuse sensibilisée.

Ainsi, la chélation du calcium soluble, qui est normalement localisé au niveau de la couche superficielle de la muqueuse nasale (chélation qui a pour conséquence d'engager l'ion calcium dans une structure chimique le rendant non réactif et qui permet de bloquer l'activité du fragment C 1 du complément) n'entraîne pas pour autant le blocage des processus biochimiques aboutissant à la destruction des structures ciliées, telle que nous l'avons constatée de façon constante par les méthodes de microscopie optique et électronique.

On peut conclure de ces résultats que la fraction C 1 du complément ne joue pas un rôle essentiel dans les processus qui aboutissent à la destruction totale des cellules ciliées constituant la bordure libre de l'épithélium nasal. Il convient de noter que cette voie d'abord du problème immunologique posé par ces destructions cellulaires qui dépendent de la réaction antigène-anticorps de surface, mérite d'être poursuivie, en particulier par le blocage immunologique d'autres fractions différentes du complément.

C O N C L U S I O N S

Identifié depuis le XVIIIème siècle et parfaitement étudié cliniquement en raison de son extrême fréquence, le rhume des foins (ou plus généralement l'allergie naso-sinusienne) offrait encore de très nombreux points obscurs dans son mécanisme pathogénique sur le plan immunologique et cellulaire.

Nous avons étudié et nous proposons, pour résoudre ces problèmes, trois modèles expérimentaux qui peuvent être appliqués à tous les animaux de laboratoire.

1 - le modèle constitué par le pollen, ou modèle à antigène fixe, permet d'étudier en microscopie optique et surtout en microscopie électronique :

- a) la pénétration du pollen dans la muqueuse des voies aériennes supérieures et les destructions qu'elle entraîne au niveau de cette muqueuse et de la sous-muqueuse ;
- b) la séquence des événements cellulaires, qui s'étend sur un laps de temps très long que ne saurait actuellement réaliser aucune culture tissulaire et qui se produisent lors de la pénétration de l'antigène particulaire au sein de la muqueuse. Cette séquence comporte un certain nombre de "vagues cellulaires" successives, qui sont dans l'ordre : les polynucléaires éosinophiles, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, enfin tardivement les plasmocytes. L'étude de cette séquence, étroitement déterminée par la chronologie de la réaction antigène-anticorps, est susceptible de fournir des arguments en faveur du contact physique entre cellules et du passage direct de l'information immunologique d'un type cellulaire à l'autre (théorie

séquentielle de la formation des immunoglobulines);

- c) ce modèle permet, enfin, de préciser quel est le devenir de la coque du pollen utilisé comme antigène ; étude qui aborde le problème de l'armement enzymatique de la muqueuse nasale sensibilisée. Cette muqueuse devient, semble-t-il, capable d'élaborer des hydrolases susceptibles de lyser des structures telles que la callose des coques polliniques ;
- d) l'ensemble des points précédents permet d'affirmer l'autonomie immunologique de la muqueuse des voies aériennes supérieures ; autonomie qui permet d'envisager sous un angle nouveau la désensibilisation de la muqueuse nasale par voie locale en cas d'allergie déterminée par des pneumallergènes.

2 - Le modèle constitué par des résines calibrées de polystyrène permet, en présence d'un antigène très complexe tel, par exemple, le pollen ou encore la poussière d'appartement, de fixer sur la résine les fractions antigéniques séparées par électrophorèse ou chromatographie, d'en analyser la ou les fractions actives et, éventuellement, d'en déterminer la constitution chimique analytique. Il serait particulièrement important, sous cet angle, de rechercher si tous les antigènes qui sont susceptibles de pénétrer au sein de la muqueuse sensibilisée n'offrent pas en commun certaines structures chimiques.

- 3 - Le dernier modèle expérimental est constitué par les globules rouges formolés (globules rouges aviaires, en particulier, qui sont aisément distingués des hématies de mammifères) et sur lesquels il est possible de copuler, par l'action du glutaraldéhyde, des antigènes de poids moléculaires élevés et dont le devenir au niveau des cellules de la muqueuse sensibilisée peut être suivi par l'étude minutée en microscopie électronique. La ferritine, d'une part, et certaines enzymes (telles les peroxydases), d'autre part, peuvent servir soit de marqueurs antigéniques, soit même directement d'antigènes.

Ce dernier modèle paraît particulièrement adapté à l'étude du mécanisme des destructions cellulaires, d'une rapidité tout à fait remarquable, dont est responsable localement la réaction antigène-anticorps. Le mécanisme de ces réactions, où entrent en jeu les anticorps de surface élaborés *in situ* par la muqueuse nasale (I.G.A.), est actuellement inconnu. Seul le rôle de certaines fractions du complément a été étudié en culture cellulaire, mais ce n'est certainement pas le seul élément en cause dans des réactions qui provoquent, en des temps de l'ordre de la minute, des lyses cellulaires définitives.

Ce dernier modèle se révélera, également, indispensable à l'étude du mécanisme de la désensibilisation, qu'elle soit locale ou générale. Il est, en effet, remarquable qu'on ignore tout, sur le plan local, des conséquences et du mécanisme d'une telle méthode de traitement, journellement utilisée. Sous le même angle, l'étude du mode d'action local des corticoïdes et, éventuellement aussi des anti-

histaminiques de synthèse, pourra tirer parti de ce modèle expérimental qui nous a permis de suivre le devenir de la ferritine utilisée, à la fois, comme antigène et comme marqueur.

La caractéristique de la biologie actuelle est de proposer des modèles expérimentaux qui, d'une part, résolvent les problèmes pour lesquels ils furent mis au point, mais qui, d'autre part, et du fait de leur existence même posent sous un jour nouveau de nouvelles questions qui, à leur tour, nécessitent le même enchaînement de processus expérimentaux.

Notre but au cours du présent travail fut de faire entrer dans une telle démarche expérimentale, l'étude de l'anaphylaxie nasale et par là de permettre l'application des méthodes de la biologie et de l'immunologie cellulaires à l'étude d'un syndrome clinique aussi répandu que l'allergie des voies aériennes supérieures.

§ §
§

B I B L I O G R A P H I E

- AFZELIUS, B.M., 1956 : On the fine structure of the pollen wall in *Clivia miniata*. *Grana Palynologica* 1, 4-5.
- 1956 : Electron microscopic investigations into exine stratification. *Grana Palynologica* 1, 12-37.
 - 1959 : Electron microscopy of the sperm tail - Results obtained with a new fixative. *J. Bioph. and Bioch. Cyt.* 5, 269-278.
- ALLANSMITH, M., 1965 : Immunoglobulins in the skin of allergic and nonallergic individuals. *J. Immun.* 95, 951.
- ARTHUS, M., 1921 : *De l'anaphylaxie à l'immunité*. Monographie - Masson et Cie Ed. 361 pages.
- BALOGH, K. Jr., 1965 : Histochemical localization of acid phosphatase activity in teeth after decalcification with E.D.T.A. *J. Histochem. Cytochem.* 15, 657-662.
- BECKER, E.L. et MUNOZ, J., 1949 : Multiplicity of antigens in Ragweed pollen extracts as demonstrate by the technic of OUDIN. *Exp. Biol. Med.* 72, 287-289.
- BESSIS, M.C. et BRETON-GORIUS, J., 1959 : Ferritin and ferruginous micelles in normal erythroblasts and hypochromic hypersideremic anemias. *Blood*, 14, 423-432.
- BLUMENAU, L., 1911 : *Über die aktive antidiphtherische Immunization der Kinder nach dem Princip von S.K. DZERJGOWSKY*. *J. athsb. Kinderh. K.* 74, 141.
- BLUMGART, H.L., 1924 : A study of the mechanism of absorption of substance from the nasopharynx. *Arch. int. Med.* 33, 415.

- BONSFIELD, G. et KING-BROWN, W.W., 1938 : Diphtheria immunization with finely atomized formol toxoid. *Lancet*, 1, 491.
- BORDET J., 1920 : *Traité de l'Immunité dans les maladies infectieuses*. Masson et Cie Ed. 711 pages.
- BRANDTZAEG, P., FJELLANGER, J. et GJERULDSSEN, S.T., 1967 : Localization of immunoglobulins in human nasal mucosa. *Immunochemistry*, 4, 57-59.
- CEBRA, J.J., 1957 : Starch block electrophoresis of Ragweed pollen antigens. *J. immunol.* 79, 118-122.
- CHEVANCE, L.G., 1952 : Cortisone et allergie nasale.
Communication à la Sté de Laryngol. des Hôpitaux de Paris. *Annales Oto-Laryng.* Paris, 69, 527-531.
- 1957 : The first stages of the nasal anaphylactic shock. *Acta Oto-Laryngol.*, 47, 480-490.
- 1960 : Etude biologique dans le domaine otologique d'un chélateur à affinité calcique. *Acta Oto-Laryngol.*, 51, 45-54.
- 1963 : Etude comparative de la décalcification des structures osseuses.... à l'aide de solutions acides et de l'E.D.T.A. *Ann. d'Histochemie*, 8, 443-452.
- CHAIT, R.A. et WALZER, M., 1950 : A technic for studying the nasal absorption of allergens in human beings. *J. Allergy*, 21, 153-168.
- COHEN, M.B., ECKER, E., BREITHIRT J.R. et RUDOLPH J.A., 1930 : The rate of absorption of ragweed pollen material from the nose. *J. of Immunol.*, 18, 419.
- COONS, A.H., LEDUC, E.H. et KAPLAN, M.H., 1951 : Localization of antigen in tissue cells VI - The fate of injected foreign proteins in the mouse. *J. Exp. Med.*, 93, 173-188.

- COONS, A.H., LEDUC, E.H. et CONNOLLY, J.K., 1955 : Studies on antibody production ; a method for the histochemical demonstration of specific antibody. *J. Exp. Med.*, 102, 49-60.
- DE DUVE, C., 1970 : Les lysosomes.
Conférence à l'Institut de Pathologie cellulaire-Hôpital du Kremlin-Bicêtre (22 janvier).
- FARRANT, J.L., 1954 : An electron microscopic study of ferritin. *Bioch. Bioph. Acta*, 13, 569-576.
- FAWCETT, D.W. et PORTER, K.R., 1954 : A study of the fine structure of ciliated epithelia. *J. Morph.*, 94, 223.
- FAZEKAS DE ST GROTH, S., 1950 : Influenza : a study in mice. *Lancet*, 1, 1101-1104.
- FRANCIS, T., 1943 : A rationale for studies in the control of epidemic influenza. *Science*, 97, 229-235.
- FRANCK, M.M., RAPP, H.J., BURSOS, T., 1964 : Studies on the terminal steps of immuno-hemolysis. *J. of Immunology*, 93, 409-413.
- GAUTHIER-VILLARS, P., 1949 : Anatomie pathologique des réactions allergiques. In *Precis des Maladies allergiques* (de PASTEUR-VALLERY-RADOT) p. 153 - Flammarion Ed. Paris.
- GIBBONS, C.R., 1960 : The relationship between the fine structure and direction of beat in gill cilia of a lamellibranch mollusc. *J. of Bioph. and Bioch. Cyt.*, 11, 179-205.
- GUTMANN, M.J., 1933 : Rund um die Pollen Allergie. *Munch. Med. Wochsch.*, 80, 258.
- HANKER, J.S., SEAMAN, A.R., WEISS, L.O., BERGMAN, K.A. et SELIGMAN, A.M., 1964 : Osmiophilic reagents : new cytochemical principle for light and electron microscopy. *Science*, 146, 1039-1043.

- HANSEL, F.K., 1936 : *Allergy of the nose and paranasal sinuses.*
St-Louis - Mosby Ed.
- HEUBNER, W., 1920 : Über Inhalation zerstäubter Flüssigkeiten.
Veber Z. Ges. Exp. Med., 10, 269-273.
- HILDING, A.C., 1961 : Regeneration of respiratory epithelium after
minimal surface trauma.
Annals of Otol., Rhin. and Laryng., 74, 883-914.
- 1966 : Time lapse relation to changes in the respira-
tory epithelium after minimal trauma.
Acta Oto-Laryngol., 57, 507-516.
- HILDING, D.H. et Coll., 1966 : Ultrastructure of tracheal and cells
during regeneration. Ann. Otol., 75, 281-294.
- JENSEN, C., 1937 : Active immunization against diphtheria by the
combined subcutaneous and intranasal method.
Proc. Roy. Soc. Med., 30, 1117-1169.
- KALLOS, et PAGEL, 1937 : Experimentelle Untersuchungen über
Asthma bronchiale. Act. Med. Scand., 91, 292.
- KASHIWA, H.K., 1966 : Calcium in cells of fresh bone stained with
glyoxal bis (2-hydroxyanil).
Stain technology, 41, 49-55.
- KEIMOWITZ, R., 1964 : Immunoglobulins in normal human tracheo-
bronchial washings : a qualitative and quanti-
tative study. J. Lab. Clin. Med., 63, 54-59.
- KLINE, B.S., COHEN, M.B. et RUDOLPH, J.A., 1932 : Histologic
changes in allergic and non allergic wheals.
J. of Allergy, 3, 531.
- LAUFBERGER, P., 1937 : Sur la cristallisation de la ferritine.
Bull. Soc. Chimie Biol., 19, 1575.
- LENDRUM, A.C., 1946 : The staining of eosinophils, polymorph and
enterochromaffin cells in histological section.
J. Path. and Bact., 56, 441-443.

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RANDALL, J.R., 1951 : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. of Biol. Chemist, 193, 265-275.
- MARTINEZ-TELLO, F.J., BRAUN, D.G. et BLANC, W.A., 1968 : Immunoglobulin production in bronchial mucosa and bronchial lymphnodes. J. of Immunology, 101, 989-1003.
- MELCHIOR, R., 1950 : *Allergie et troubles vasomoteurs de la muqueuse nasale et sinusienne.* Acta Medica Belgica - Monographie 160 pages - Masson et Cie.
- MULLER-EBERHARD, H.J., 1969 : The Complement. Annual review of biochemistry, 389-414.
- OGRA, P.L. et KARZON, D.T., 1969 : Distribution of poliovirus antibody in serum nasopharynx and alimentary tract following segmental immunization of lower alimentary tract with polio vaccine. J. of Immunology, 102, 1423-1430.
- 1969 : Poliovirus antibody response in serum and nasal secretions following intranasal inoculation with inactivated poliovaccine. J. of Immunology, 102, 15-23.
- PROETZ, A.W., 1941 : Essays on the applied physiology of the nose. Ann. Publ. comp. St-Louis.
- RICHET, CH., 1902 : *L'anaphylaxie.* F. Alcan Ed. - 2ème éd.
- RICHET, CH. et PORTER, 1902 : L'action anaphylactique de certains venins. C.R. Soc. Biologie - p. 170.
- RICHTER, M. et SEHON, A.H., 1966 : Allergen of ragweed pollen. J. Allergy, 31, 111.
- RICHTNER, N.G., 1943 : On the problem of intranasal medication. Acta Oto-Laryng. Suppl. 49.

- RUDOLPH, J.A. et COHEN, M.B., 1934 : Vasomotor rhinitis with negative skin tests, a local nasal allergy. *J. Allergy*, 5, 476-480.
- SABESIN, S.M., 1963 : A function of the eosinophil : phagocytosis of antigen-antibody complexes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112, 667-670.
- SAINTE MARIE, G., 1962 : A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. of Histochem. Cytochem.*, 10, 250-256.
- SAITO, W., 1912 : Experimentelle Untersuchungen über die quantitative Absorption von Staub. *Arch. Hyg.* 75, 134.
- SEHON, A.H. et RICHTER, M., 1959 : Studies on ragweed pollen IV isolation and characterization of an allergic fraction from ragweed pollen. *J. of Immunology*, 82, 190.
- SELIGMAN, A.M., HANKER, J.S., WASSERKRUG, H., DMOCHOWSKI, H. et KATZOFF, L., 1965 : Histochemical demonstration of some oxidized macromolecules with thiocarbahydrazide or thiosemicarbahydrazide and osmium tetroxide. *J. of Histochem. Cytochem.*, 13, 629-639.
- SIMON, F.A. et RACHEMANN, F.M., 1934 : The development of hypersensitiveness in man. Absorption of antigen through the nasal mucous membrane. *J. Allergy*, 5, 451-456.
- SINGER, S.J., 1959 : Preparation of an electron dense antibody conjugate. *Nature*, 183, 1523-1524.
- SMITH, C.B., BELLANTI, J.A. et CHANOCK, R.M., 1967 : Immunoglobulins in serum and nasal secretions following infection with type 1 parainfluenza virus and injection of inactivated vaccines. *J. of immunology*, 99, 133-141.
- SPEIRE, R.S., 1958 : Advances in the Knowledge of the eosinophil relation to antibody formation. *Annals N.Y. Acad. Scienc.*, 73, 283-306.

- STOCKINGER, L. et BURIAN K., 1957 : Die Regeneration des Flimmer-
epithels der Nase nach Verarzung mit Zinksulfat.
A. mikroskopish. anat. Forsch., 63, 193-211.
- STRÖMME, O. 1952 : Studies on the histopathology of pollinosis.
Acta Oto-Laryng. Suppl. 104.
- 1955 : On histological reactions in allergic nasal
mucosa caused by pollen.
Acta allerg., 84, 251-255.
- THIERY, J.P., 1967 : Mise en évidence des polysaccharides sur
coupes fines en microscopie électronique.
J. de Microscopie, 6, 987-1018.
- 1968 : Ultrastructure et fonctions des cellules
impliquées dans la réaction immunitaire.
Bulletin de la Société de Chimie Biol.,
50, 1077-1099.
- TOMASI, T.B., TAN, E.M., SALOMON, A. et PRENDERGASI, R.A., 1965 :
Characteristics of an immun system common
to certain external secretions.
J. Exp. Med., 121, 101-125.

§

§

§

